

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Estudo da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) por ultracentrifugação analítica e fluorescência em função do pH.**

FRANCISCO ADRIANO DE OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Química de São Carlos,  
como requisito para obtenção do título  
de Mestre em Ciências: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos / SP

2009

---

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Oneide e Raimundo Nonato, pelo estímulo, força e dedicação. Obrigado por poder contar com vocês mesmos quando estão distante.

À minha única e querida irmã pelos bons momentos que tivemos juntos, pelo seu carinho e admiração.

Aos meus amigos que convivem comigo, por compartilharem dos bons e maus momentos da minha vida e por sempre me apoiarem.

---

## Agradecimentos

A minha mãe por todo apoio, dedicação, carinho e motivação, pois sem a presença dela na minha vida, sendo meu ponto de apoio, âncora eu jamais teria atingidos objetivos;

Ao meu pai pelo esforço, ajuda e ensinamentos indiretos, que me fizeram definir com clareza o homem que eu queria me tornar;

À minha irmã, Luordes, pelo amor, carinho e afeto que temos;

À Senhora Maria do Nascimento (Nasci) por ter exercido um papel importante na minha educação, pelo incentivo e por ter sido uma verdadeira mãe para mim;

Aos meus amigos (Irmãos) que convivem comigo aqui em São Carlos, pelo apoio moral e pela contribuição direta e indireta na minha formação e neste trabalho. Obrigado em especial a vocês: Wilson, Orlando e Thairo;

---

Aos meus amigos (Irmãos) da Física, Washington, Alexandre e Mike pelo acolhimento em sua casa quando Eu e o Orlando chegamos em São Carlos e pela amizade que construímos.

Ao Professor Marcel Tabak por sua orientação e pelos laços de amizades e respeito que se formaram nesta convivência. Obrigado pela oportunidade de poder aprender um pouco do seu conhecimento.

Ao Professor Júlio Borges pela contribuição direta neste trabalho, ensinando-me a manusear os programas de análises.

Aos professores da graduação na UESPI, Geraldo, Nougá, Graça, Rita de Cássia, Cícero, por terem participado da minha formação acadêmica;

À minha querida madrinha, Patrícia, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, amizade e pela boa convivência;

Ao Ezér Biazin, técnico do laboratório, por toda ajuda na parte instrumental e que sem nenhuma dúvida foi muito importante para o bom desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que se construiu nestes dois anos;

Aos amigos do laboratório, Marilene e Diógenes pela boa convivência, embora o primeiro não esteja mais na equipe os laços de amizade continuam.

---

As amigas da Bioquímica, Virgínia, Marília, Fabiana, pela boa convivência de todos os dias;

As amigas Piauienses, Janete, Adriana, Elenice, Eliene e Sâmea além das recém chegadas Hendriane, Adriane e Sumária, pela amizade e pela tolerância para comigo;

Aos meus amigos Piauienses, José Luis, Jairo, Valdomiro e Flávio pelo apoio e em especial ao Edvan, por uma amizade embora recente é sólida;

Aos amigos do Paraná, Lenilson e Hércules pelo carinho e respeito;

Aos meus amigos da graduação, Karla, Leilane, Jaelson, Luciano, Moisés, pela boa convivência durante quatro longos e bons anos;

Aos meus colegas de turma e maranhenses, Tuarne, Ulisses, Fernanda e Roberta pela boa convivência e pela participação em minha vida;

As meninas da pós-graduação, Sílvia e Andréia por toda a atenção, carinho e pelos bons serviços prestados.

Ao CNPq pela bolsa concedida nestes dois anos de trabalho;

---

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela oportunidade concedida, propiciando a realização das medidas de Ultracentrifugação Analítica (AUC) e o desenvolvimento deste trabalho;

---

## Resumo

A hemoglobina extracelular gigante do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) é homóloga à hemoglobina da *Lumbricus terrestris* (HbLt). Baseado nos estudos de MALDI-TOF-MS foi determinada a massa molecular (MM) das subunidades da HbGp. Entretanto, ainda não era possível propor o valor exato da MM para a HbGp íntegra, pois a estequiometria deste oligômero ainda não era totalmente clara. Este trabalho objetiva avaliar a massa molecular do oligômero em dois estados de oxidação: oxi- e cianometa-HbGp, bem como avaliar a estabilidade desta proteína, ou seja, a dissociação e desnaturação em função do pH em meio ácido. O estudo por ultracentrifugação analítica permitiu uma avaliação independente da massa molecular da HbGp. Valores de MM de  $3600 \pm 100$  e  $3700 \pm 100$  kDa foram obtidos para a oxi- e cianometa-HbGp, respectivamente. Estes valores estão de acordo com a massa esperada, assumindo a estequiometria proposta por Vinogradov para a HbLt. Os dados de ultracentrifugação para as amostras do monômero **d** puro mostraram um coeficiente de sedimentação de  $1,95 \pm 0,04$  S para ambos os valores de pH 7,0 e 10,0. Além disso, as distribuições  $c(s)$  do monômero **d** puro indicaram que uma pequena contribuição (5%) de dímero de monômeros, **d<sub>2</sub>**, com valores de  $s_{20,w}^0$  de 3,2 S estava presente em solução. Para a oxi-HbGp íntegra no pH 10,0 nenhuma contribuição em 58 - 59 S foi observada, sugerindo completa dissociação oligomérica. As distribuições  $c(s)$  mostraram dois picos adicionais em relação ao monômero puro: um pico em 4,2 - 4,4 S, que está associado ao trímero, **abc**; e um segundo pico em 5,8 - 6,0 S, que poderia ser associado ao tetrâmero, **abcd**. A adição de  $\beta$ -mercaptoetanol leva ao desaparecimento do pico em 4,2 S, consistente com a redução das pontes dissulfeto do trímero **abc** e produção dos monômeros **a**, **b** e **c**. Cerca de 19 % da forma cianometa-HbGp íntegra coexiste em equilíbrio com as subunidades dissociadas. Finalmente, estudos em meio ácido mostravam que na faixa de pH 5,0 - 7,0 as três formas de oxidação de HbGp apresentaram alta estabilidade oligomérica. Abaixo de pH 5,0 os dados de fluorescência mostrava que a estabilidade diminui na sequência cianometa > oxi >

---

meta. Assim a estabilidade das formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp foi avaliada, ficando evidenciada a maior estabilidade da forma cianometa-HbGp.



---

## Abstract

The giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) is homologous to *Lumbricus terrestris* (HbLt). Based on MALDI-TOF-MS the molecular masses (MM) of HbGp subunits were determined. However, the exact value of the MM for the HbGp oligomer is not known. This study has as a main goal to evaluate the molecular weight of the oligomer in two oxidation states: oxy- and cyanomet-HbGp. Also the stability of the protein dissociation and denaturation as a function of pH was monitored. The present analytical ultracentrifugation study allowed us to assess the molecular mass of the whole oligomer giving values of MM of  $3600 \pm 100$  and  $3700 \pm 100$  kDa for the oxy- and cyanomet-HbGp, respectively. These values are in agreement with the expected mass based on Vinogradov model for HbLt. Data were obtained of  $s_{20,w}^o$  for the pure monomer **d** as  $1.95 \pm 0.04$  S for both pH values 7.0 and 10.0. C(s) distributions for pure monomer indicated that a small contribution of dimer of monomers (5%), **d**<sub>2</sub>, was also present with  $s_{20,w}^o$  of 3.2 S in solution. For the whole oxy- HbGp at pH 10.0 no contribution at 58 - 59 S was observed, suggesting complete oligomeric dissociation. C(s) distribution showed two additional peaks as compared to pure monomer: a peak at 4.2 - 4.5 S, probably due to the trimer, **abc**; a second peak at 5.8 - 6.0 S, that could be associated to the tetramer, **abcd**. Addition of beta-mercaptoethanol leads to the disappearance of the peak at 4.2 S, consistent with the reduction of the trimer **abc** disulfide bridges and production of monomers **a**, **b** and **c**. It may be noted that about 19% of cyanomet-HbGp, undissociated, coexist in equilibrium with the isolated subunits. Finally, studies in acidic pH values show that in the pH range 5.0-7.0 the oligomeric stability for the three oxidation forms of HbGp is quite high. Below pH 5.0, fluorescence emission data suggest that the stability is reduced in the following order: cyanomet > oxy > met-HbGp. Thus the stability of the oxy-, meta- and cyanomet-HbGp forms was evaluated evidenced making it clear the higher stability of the cyanomet-HbGp.

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estruturas de duas hemoproteínas:(A) Hemoglobina Humana e (B) Citocromo C [1].....	21
<b>Figura 2:</b> O grupo prostético heme (A). (B) estrutura tridimensional da mioglobina.....	22
<b>Figura 3:</b> Grupo heme da mioglobina humana, mostrando as seis coordenações do Ferro.....	24
<b>Figura 4:</b> (A) – Grupo Heme na forma T – desoxihemoglobina e (B) - Na na forma R – oxi-hemoglobina .....	25
<b>Figura 5:</b> Estrutura cristalográfica da hemoglobina íntegra de <i>Lumbricus terrestris</i> (Homóloga da HbGp).....	28
<b>Figura 6:</b> Estrutura cristalográfica das subunidades da HbLt (Linkers).....	29
<b>Figura 7:</b> (A) Análise do espectro de MALDI-TOF-MS da oxi-HbGp nativa no pH 7,0...30	
<b>Figura 8:</b> Análise do espectro de MALDI-TOF-MS do monômero <i>d</i> puro isolado.....	33
<b>Figura 9:</b> Forças que atuam em uma partícula em solução.....	55
<b>Figura 10:</b> Gráfico do perfil da concentração em função do tempo e distância radial. ...	58
<b>Figura 11:</b> Diagrama de Jablonsk.....	67
<b>Figura 12:</b> Dados parciais de velocidade de sedimentação mostrando o ajuste através do SEDFIT, para oxi-HbGp.. .....	72

---

<b>Figura 13:</b> Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da oxi-HbGp no pH 7,0..	74
<b>Figura 14:</b> Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da cianometa-HbGp no pH 7,0.....	75
<b>Figura 15:</b> Distribuição contínua de massa molecular da HbGp nas formas oxi e cianometa no pH 7,0..	77
<b>Figura 16:</b> $s_{20,w}$ versus a concentração de HbGp..	81
<b>Figura 17:</b> Variação da densidade de proteína em relação à densidade da solução tampão..	85
<b>Figura 18:</b> Distribuição do coeficiente sedimentação para o monômero $d$ .....	88
<b>Figura 19:</b> $s_{20,w}$ versus a concentração do monômero $d$ nos valores de pH 7,0 e 10,0. .....	90
<b>Figura 20:</b> Distribuição da massa molecular $c(M)$ para o monômero $d$ .....	93
<b>Figura 21:</b> Distribuição do coeficiente de sedimentação para oxi-HbGp no pH 10,0). ..	95
<b>Figura 22:</b> Distribuição do coeficiente de sedimentação para oxi-HbGp em pH 10,0 com $\beta$ -mercaptoethanol. ....	97
<b>Figura 23:</b> Dados parciais de velocidade de sedimentação obtidos através do programa SEDFIT, para cianometa-HbGp no pH 10,0.....	99
<b>Figura 24:</b> Distribuição do coeficiente de sedimentação para a cianometa-HbGp pH 10,0..	100
<b>Figura 25:</b> Espectros de emissão de fluorescência da HbGp nas formas ciano, meta e oxi.....	103

---

<b>Figura 26:</b> Fluorescência normalizada para a oxi-, meta- e cianometa-HbGp.....	104
<b>Figura 27:</b> Intensidade de luz espalhada em função do pH para a três formas da HbGp: meta, cianometa e oxi. ....	105
<b>Figura 28:</b> Janela de entrada do programa SEDFIT.....	119
<b>Figura 29:</b> Dados iniciais salvos no programa SEDFIT.....	120
<b>Figura 30:</b> Definição dos meniscos. ....	121
<b>Figura 31:</b> Definição dos parâmetros de entrada.. ....	122
<b>Figura 32:</b> Interface do programa SEDFIT mostrando um ajuste rápido (Run) da cianometa-HbGp.. ....	123
<b>Figura 33:</b> Ajuste idêntico ao da figura 32. No entanto a resolução que anteriormente era de 100 foi aumentada para 300. . ....	124
<b>Figura 34:</b> Dados da oxi-HbGp no pH 10,0 tratada pelo Modelo Continuous c(s) Conformational Model.. ....	125

---

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Resumo das análises de AUC da HbGp nas formas oxi e cianometa em 236 nm e $20,0 \pm 0,1$ °C.....	78
<b>Tabela 2:</b> Dados hidrodinâmicos experimentais e preditos para oxi e cianometa-HbGp. ....	79
<b>Tabela 3:</b> Coeficientes de sedimentação para o monômero <i>d</i> puro e para as espécies dissociadas das formas cianometa e oxi no pH alcalino. ....	91
<b>Tabela 4:</b> Contribuição percentual de todas as espécies observadas em equilíbrio nas amostras descritas na Tabela 03. ....	92

---

## Lista de abreviações e Siglas

**a** – Subunidade monomérica **a** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**abc** – Subunidade trímica da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**abcd** – Subunidade tetramérica da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**AUC** – Do inglês “Analytical Ultracentrifugation”

**3abcd** – Subunidade dodecamérica da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**b** – Subunidade monomérica **b** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**c** – Subunidade monomérica **c** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**c (M)** – Modelo de análise de dados pelo SEDFIT, para calcular a massa molecular

**c (s)** – Modelo de análise de dados pelo SEDFIT, para calcular o coeficiente de sedimentação

**cmc** – Concentração micelar crítica

**CTAC** – Cloreto de cetiltrimetilamônio

**d** – Subunidade monomérica **d** da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

---

**D** – Coeficiente de difusão

**D<sub>20, w</sub><sup>0</sup>** – Coeficiente de difusão convertido para condições padrão ( água a 20 °C) e extrapolado para concentração infinitamente diluída da amostra em estudo

**D<sub>h</sub>** – Diâmetro Hidrodinâmico

**DLS** – Espalhamento Dinâmico de Luz

**ε** – Absortividade molar

**F<sub>c</sub>** – Força centrípeta

**F<sub>emp</sub>** – Força de empuxo

**F<sub>f</sub>** – Força friccional

**f** – Coeficiente friccional

**f/f<sub>0</sub>** – Razão friccional

**HbGp** – Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

**HbLt** – Hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris*

**HPS** – Hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato

**L** – Cadeia linkers

**m** – massa

---

**MALDI-TOF-MS** – Do inglês “Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry”

**MM** – Massa Molecular

**$N_{Av}$**  – Número de Avogrado

**s** – Coeficiente de sedimentação

**$s^*$**  - Coeficiente de sedimentação experimental

**$s_{20,W}$**  – Coeficiente sedimentação em água a 20 °C

**$s^0_{20,W}$**  – Coeficiente sedimentação convertido para condições padrão ( água a 20 °C) e extrapolado para concentração infinitamente diluída da amostra em estudo

**S** – Unidade de medida do coeficiente de sedimentação [Svedberg ( $10^{-13}$  s)]

**SAXS** – Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

**SDS** – Dodecilsulfato de sódio

**SEDFIT** – Software de ultracentrifugação utilizado no tratamento dos dados

**SEDNTERP** – Software utilizado para converter os valores experimentais do coeficiente de sedimentação para  $s_{20,W}$

**SE** – Sedimentação em equilíbrio

**$S_n$**  – Estado Singlete



---

**SV** – Velocidade de Sedimentação

**R** – Constante dos gases ideais

**R<sub>H</sub>** – Raio Hidrodinâmico

**k<sub>b</sub>** – Constante de Boltzmann

**V<sub>bar</sub>** – Volume parcial específico

**T<sub>n</sub>** – Estado tripleto

---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1. Hemoproteínas .....	20
1.2. Hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i> .....	26
1.3. Desnaturação de proteínas .....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
3.1. Extração e purificação da HbGp .....	43
3.2. Medidas de Ultracentrifugação Analítica - Velocidade de Sedimentação (SV)..	44
3.2.1. Preparação das amostras da Oxi-HbGp, cianometa-HbGp e monômero <i>d</i> .....	44
3.2.1.a – Oxi-HbGp .....	44
3.2.1.b – Cianometa-HbGp .....	45
3.2.1.c – HbGp (monômero <i>d</i> ) .....	46
3.3. Medidas de Fluorescência e espalhamento de luz.....	48
3.3.1. Preparação das amostras nas formas oxi, meta e cianometa-HbGp em diferentes valores de pH para medidas de fluorescência e espalhamento. ....	48

---

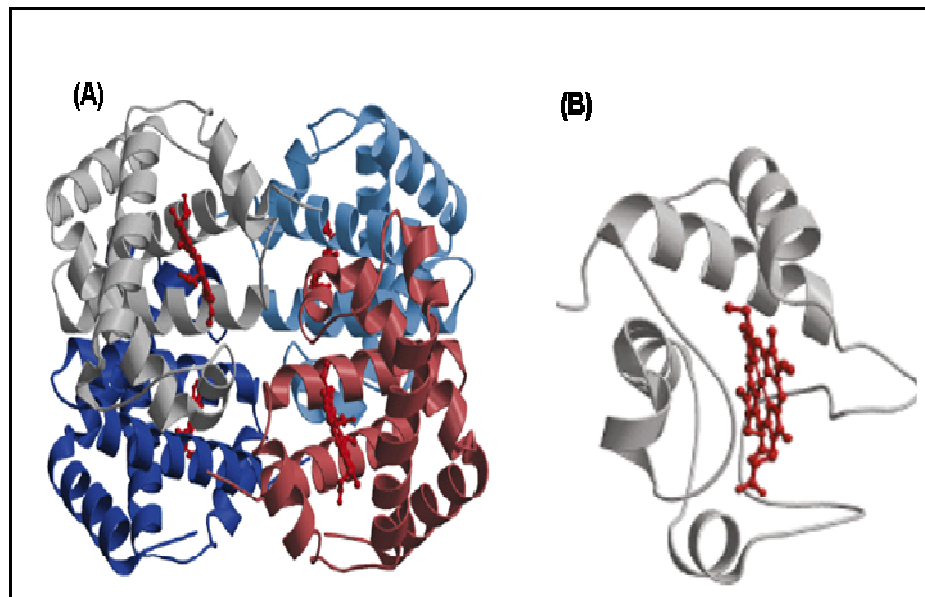
4. TÉCNICAS DE ESTUDO .....	50
4.1. Ultracentrifugação Analítica (AUC) .....	50
4.2. Tratamento dos dados de Ultracentrifugação analítica.....	60
4.3. Determinação independente do $V_{bar}$ de proteínas por densitometria .....	65
4.4. Fluorescência .....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
5.1. Resultados de ultracentrifugação analítica (AUC) .....	71
5.1.1. Estudos em pH 7,0 das formas oxi e cianometa-HbGp.....	71
5.1.2. Determinação Independente do $V_{bar}$ .....	84
5.1.3. Monômero <i>d</i> puro nos pHs 7,0 e 10,0 .....	85
5.1.4. Oxi-HbGp em pH 10,0, na ausência e presença de $\beta$ -mercaptoethanol ....	94
5.1.5. Cianometa-HbGp em pH 10,0.....	98
5.2. Medidas em meio ácido.....	101
5.2.1. Medidas de fluorescência.....	101
5.2.2. Espalhamento de luz.....	104
6. CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
APÊNDICE .....	118

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Hemoproteínas

As proteínas participam dos mais variados processos nos seres vivos, dentre os quais podemos destacar importantes funções como: transporte, catálise, revestimento e defesa [1, 2].

Globinas e citocromos (Figura 01) são exemplos de hemoproteínas com elevada especificidade de funções numa variedade de seres vivos. Apesar de amplamente estudados, os sistemas hemoproteicos ainda permanecem intrigantes sob vários aspectos físico-químicos. Dentro deste contexto, o uso de diferentes técnicas biofísicas contribuiu significativamente para a evolução no entendimento da relação estrutura-atividade destes sistemas [3,4].



**Figura 1:** Estruturas de duas hemoproteínas bastante estudadas: (A) Hemoglobina Humana, cuja principal função é transporte de oxigênio; em (B) Citocromo C, cuja função é o transporte de elétrons na cadeia respiratória [1].

As hemoproteínas constituem um dos sistemas mais relevantes dentro da química de proteínas e enzimas. As propriedades intrínsecas das hemoproteínas, assim como a sua relação estrutura-atividade, envolvem fenômenos tais como cooperatividade e afinidade por ligantes específicos, como o oxigênio, que estão associados a uma variedade de processos que viabilizam a vida [1,3-5]. A capacidade das globinas em ligar ao oxigênio depende da presença do grupo prostético (heme), mostrado na, Figura 02.

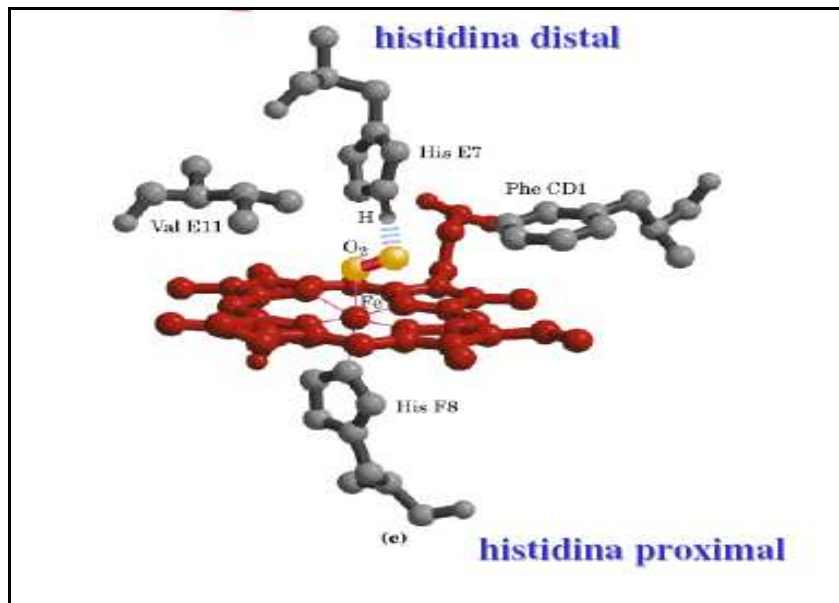
As hemoproteínas são constituídas por cadeias polipeptídicas, e por um grupo, não peptídico, denominado de grupo heme. Este grupo não polipeptídico consiste de uma protoporfirina (parte orgânica) e um átomo de ferro central (parte inorgânica) que



---

nitrogênio do grupo imidazol oriundo de uma histidina proximal, que serve como ponto de fixação do grupo heme na cadeia polipeptídica da proteína, e a sexta coordenação está livre, para ser coordenada com um ligante endógeno, como mostra a (Figura 03). Nas hemoproteínas no seu estado nativo, este ligante endógeno geralmente é o oxigênio [1, 6]. Outro resíduo muito importante na coordenação do oxigênio no Ferro é a Histidina distal - E7, ou seja, Histidina que se encontra na hélice (E) e no resíduo 7, cuja principal função é a estabilização da molécula de oxigênio, quando a mesma se encontra ligada ao heme [7].

A hemoglobina é encontrada exclusivamente nos eritrócitos, onde sua principal função é transportar oxigênio dos pulmões até os capilares dos tecidos [7]. A hemoglobina A, a principal hemoglobina em adultos, é composta por quatro cadeias polipeptídicas - duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  - mantidas unidas por meio de ligações não-covalentes, (Figura 1A). Cada cadeia tem estrutura primária, secundária e terciária. O ferro do heme está presente nas quatro cadeias, estando ligado à histidina proximal [1]. Cada subunidade contém segmentos de estrutura em hélice alfa, além de uma fenda, ou bolso, onde se liga o grupo heme. Como é mostrado na (Figura 2B), o grupo heme encontra se ligado na hélice F no resíduo 8 (Histidina proximal) [1].

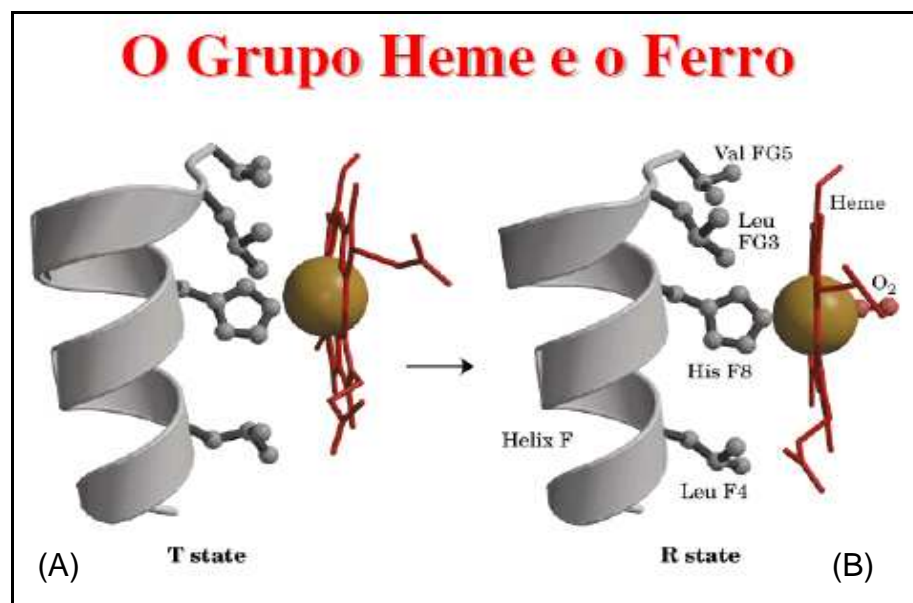


**Figura 3:** Grupo heme da mioglobina humana, mostrando as seis coordenações do Ferro. Em amarelo aparece a molécula de oxigênio coordenada, em vermelho o grupo porfirínico, em cinza na parte inferior a Histidina proximal (F8 – resíduo oito da hélice – F) [1].

Na hemoglobina humana, assim como na hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, HbGp, a ligação com o oxigênio é altamente cooperativa [1]. Esta Hemoglobina extracelular é extraída de um anelídeo da espécie *Glossoscolex paulistus*. Este organismo trata-se de uma minhoca bastante comum em Rio Claro e Piracicaba no interior de São Paulo. Para executar sua função fisiológica, ou seja, de transporte de oxigênio de forma efetiva a hemoglobina deve ligar-se ao oxigênio tão eficiente quanto possível nos pulmões, e liberá-lo facilmente nos outros tecidos [1,7]. Para realizar esta tarefa, a hemoglobina possui alta afinidade por oxigênio em ambiente saturado de O<sub>2</sub> e baixa afinidade à baixa saturação de O<sub>2</sub>. *In vivo*, a hemoglobina pode apresentar duas estruturas quaternárias distintas. Uma é a estrutura T (forma tensa),



característica da forma desoxihemoglobina, e que tem baixa afinidade ao oxigênio; a outra é a estrutura R (forma relaxada), característica da forma oxi-hemoglobina (4 moléculas de oxigênio ligadas) e que possui alta afinidade ao oxigênio, como mostra a (Figura 04) [7]. A oxigenação da hemoglobina é, portanto, acompanhada pelo movimento do átomo de ferro e, conseqüentemente, pelo movimento de His F8 e os resíduos ligados covalentemente a His F8, em direção ao plano do anel. Este movimento gera uma nova conformação das porções da proteína [1, 7].



**Figura 4:** (A) Grupo heme na forma T (tensa) – desoxihemoglobina e (B) – Grupo heme na forma R (relaxada) – oxi-hemoglobina [ 7 ].

Nos eritrócitos (glóbulos vermelhos), as hemoglobinas encontram-se em um equilíbrio das duas formas, cuja concentração da forma parcialmente ligadas é baixa [6, 8,9]. A ligação de oxigênio induz mudanças estruturais que alteram a energia livre

---

relativa entre as duas formas, mudando o equilíbrio em favor da forma de alta afinidade. Partindo da estrutura desoxigenada, conformação T (tensa), a ligação parcial de oxigênio (duas ou três moléculas) é suficiente para mudar o equilíbrio em favor da conformação R (relaxada), que capturará os oxigênios restantes com maior afinidade.

Contrariamente, quando a hemoglobina encontra-se na forma R, ou seja, totalmente oxigenada, a perda de um ou dois oxigênios muda o equilíbrio para a forma de baixa afinidade, estimulando a liberação dos oxigênios restantes [9].

## **1.2. Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus***

Diferentemente da hemoglobina humana, a hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) que é extraída de um anelídeo, (uma minhoca) é um sistema ainda pouco conhecido quanto aos fatores que conferem a esta proteína propriedades como: alta resistência à oxidação e dissociação oligomérica, e cooperatividade em uma mesma unidade tetramérica [2,3]. Portanto as hemoglobinas extracelulares representam um importante objeto a ser estudado, para que possamos entender melhor estes sistemas.

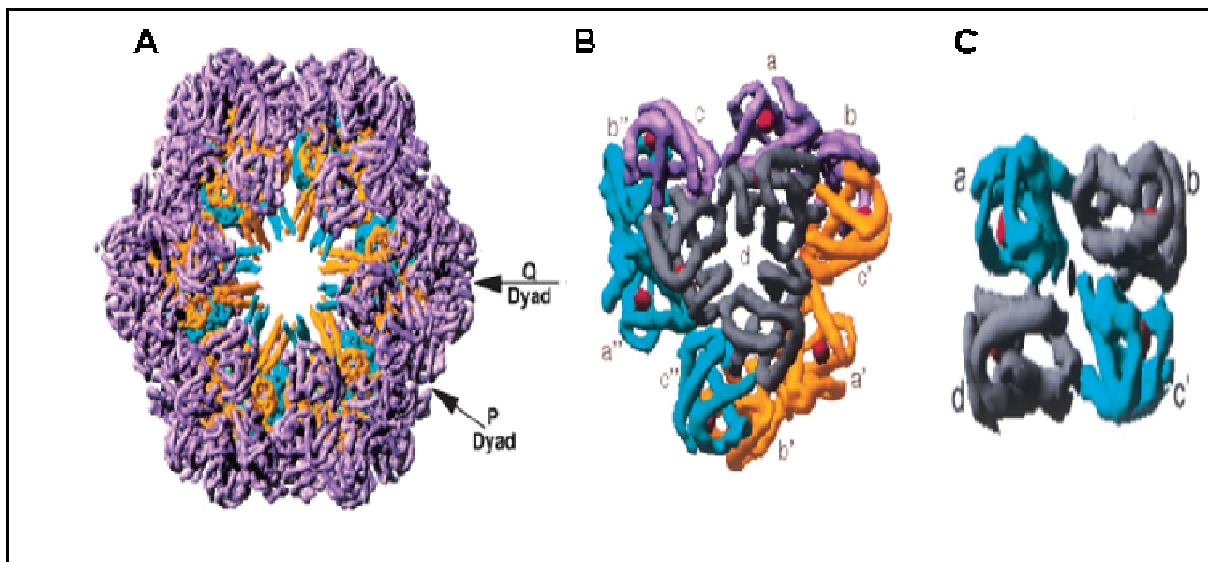
Considerando a importância destes sistemas, foi realizado um estudo para determinar a massa de uma hemoglobina extracelular gigante e de suas subunidades que, segundo Vinogradov [10], constitui o ápice de complexidade em proteínas que transportam oxigênio. A hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) pertence à

---

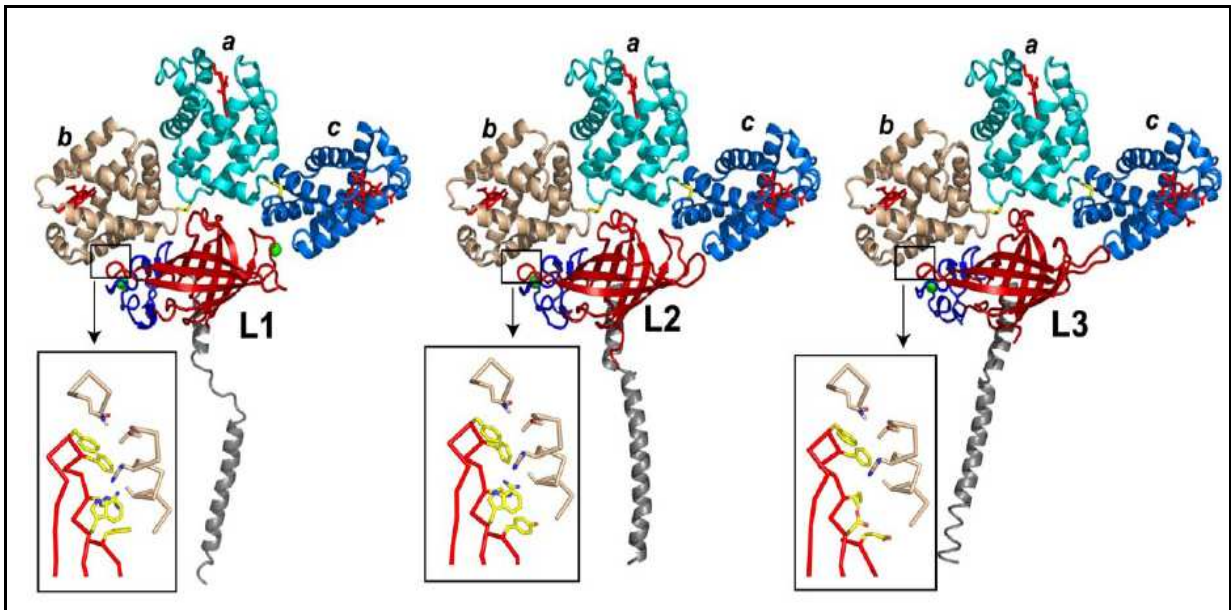
classe das hemoglobinas extracelulares gigantes. A HbGp é semelhante, no que desrespeito a estrutura à hemoglobina de *Lumbricus terrestris* (HbLt) que vem sendo extensamente estudada por vários grupos de pesquisa [2-10]. Assim, a hemoglobina a ser estudada no presente trabalho será extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) e apresenta uma massa molecular mínima de aproximadamente 3.1 MDa [11], determinada há cerca de 20 anos por ultracentrifugação em gradiente de concentração de sacarose.

Tendo em vista a alta similaridade estrutural entre HbGp e HbLt pode-se propor que a macroproteína em estudo apresenta uma disposição altamente organizada envolvendo 144 cadeias polipeptídicas com grupo heme e 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme, que são chamadas cadeias *Linker* (Figura 05) [12]. A estrutura oligomérica é composta de dois discos hexagonais, que formam uma espécie de bicamada hexagonal sendo que a dissociação dessa estrutura origina a formação de doze unidades de massa molecular 1/12 da molécula íntegra [12,13]. A proteína gigante é composta por quatro subunidades, com enovelamento típico para globinas, que contém o grupo heme, denominadas de cadeias **a**, **b**, **c** e **d**, sendo que as subunidades **a**, **b** e **c** estão ligadas por pontes dissulfeto formando o trímero (**abc**) e a subunidade **d** mantêm-se na forma monomérica [14]. Além destas quatro subunidades que contém o grupo heme, a proteína possui três cadeias polipeptídicas distintas que não tem esse grupo, denominados de linkers. O papel destas subunidades está provavelmente relacionado com a manutenção da estabilidade da estrutura oligomérica.

No caso da hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris*, extraída de uma minhoca comum no hemisfério norte, especialmente na região de Vancouver, Canadá, as subunidades são bem conhecidas em termos de seqüência primária e a estrutura da macroproteína tem sido estudada na forma cristalográfica pelo grupo de W. E. Royer Jr [13]. A estrutura cristalográfica da HbLt foi reportada na literatura inicialmente com baixa resolução de 5,5 Å [14], e mais recentemente esta estrutura foi refinada até 3,5 Å [13], (Figura 05). Estes trabalhos mostram em bastante detalhe a disposição na bicamada hexagonal das várias cadeias polipeptídicas que compõem a proteína, incluindo as cadeias do tipo globinas e os linkers (Figuras, 05 e 06).

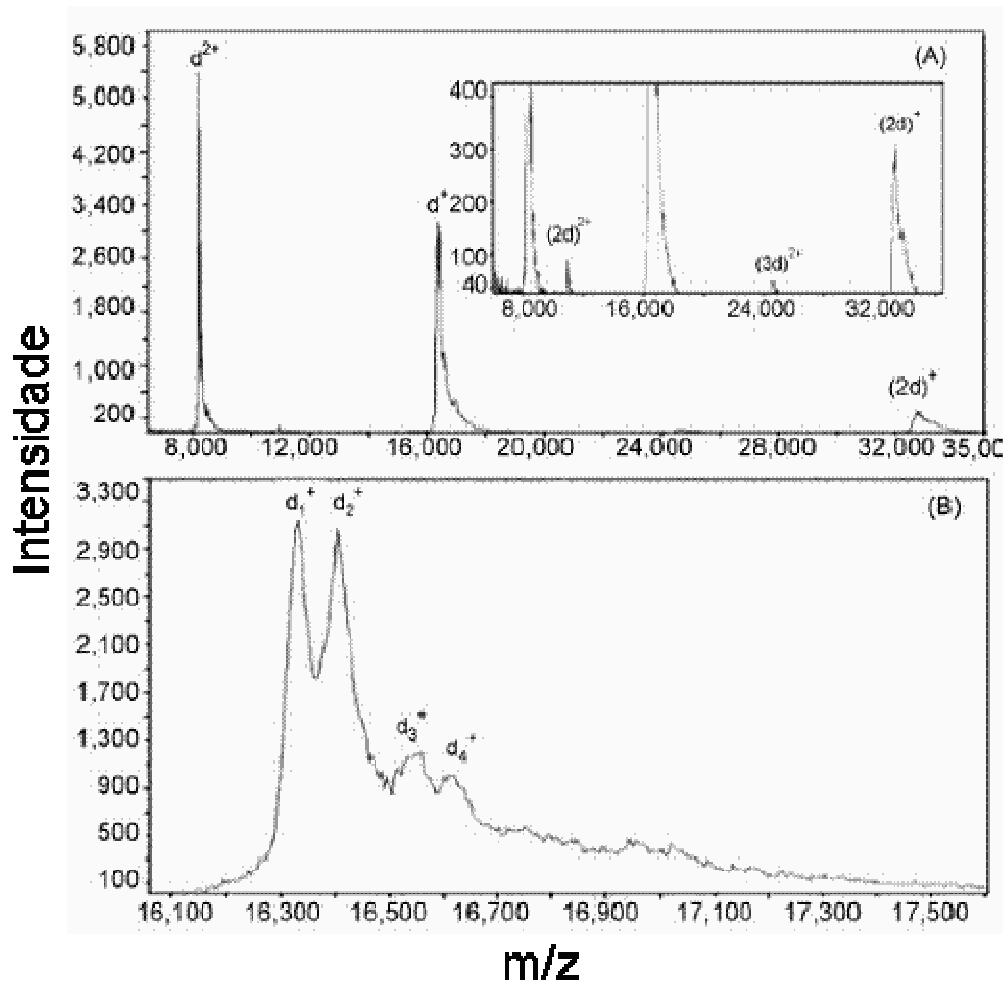


**Figura 5:** Estrutura cristalográfica da hemoglobina íntegra de *Lumbricus terrestris* (Homóloga da HbGp). (A) Estrutura oligomérica, constituída por dois discos Hexagonais sobrepostos (modelo de braceletes); B) Dodecâmero (abcd)<sub>3</sub> e (C) Tetrâmero (abcd) [13].



**Figura 6:** Estrutura cristalográfica das subunidades da HbLt. Podemos observar da esquerda para direita os Linkers 1, 2 e 3 conectados a unidade dodecamérica  $(abcd)_3$ , respectivamente. Os destaques mostram os pontos de contatos das cadeias Linkers com as globinas.

A homologia da HbGp com a HbLt está baseada na sequência da cadeia *d*, tendo esta cadeia 57 % de identidade e em estudos por microscopia eletrônica onde a presença de estruturas hexagonais, em pH 7,3 correspondentes à proteína nativa, e o seu desaparecimento em pH 8,6, foram evidenciados [15]. Recentemente, através de estudos envolvendo a técnica de MALDI-TOF-MS, foi obtida informação detalhada sobre as subunidades da HbGp, o que confirmou a alta homologia da HbGp com a HbLt. A identidade de 57% da subunidade *d* das duas proteínas corrobora reforça este resultado. [16]. Foi observado que o monômero *d* possui MM em torno de 16,6 kDa, o trímero *abc* apresenta MM de 52 kDa e as cadeias linkers são observadas com MM de 26-32 kDa [16] (Figura 07).



**Figura 7:** (A) Análise do espectro de MALDI-TOF-MS da monomero-d nativa no pH 7,0. A inserção mostra a intensidade em unidades arbitrárias, destacando os picos menores (Linkers (L), monômero (d), trimeros (abc)); (B) a região expandida para o monômero d monoprotonado  $d^+$  na faixa de 15600 a 18800 Da. As atribuições dos picos foram feitas por comparação com dados da literatura para homóloga HbLt [16,17].

Assim, duas isoformas majoritárias do monômero  $d$  ( $d_1$  e  $d_2$ ) de proporções idênticas com MM de  $16,355 \pm 25$  e  $16,428 \pm 24$  Da, respectivamente, e duas isoformas de menor intensidade ( $d_3$  e  $d_4$ ) com MM em torno de 16,6 kDa foram observadas, (Figura 07). Baseando-se nas MM destas subunidades foi determinada por

---

espectrometria de massas e considerando que a estequiometria do oligômero da HbGp é  $12(\text{abcd})_3\text{L}_3$  [18,19], podemos prever que a MM da HbGp é em torno de 3.4 MDa, um valor maior do que o observado anteriormente por Costa e colaboradores [11] e que permanece como a única referência disponível de MM total da HbGp. Entretanto, apesar de que os valores de MM das subunidades obtidos por espectrometria de massa são conhecidos, ainda não é possível propor o valor exato da MM da HbGp, pois não é conhecida exatamente qual é a estequiometria do oligômero. Por estas razões, a determinação da MM total da HbGp na sua forma íntegra permanece uma questão relevante a ser investigada, sendo um dos objetos de estudos do presente estudo.

Esta classe de hemoglobina é altamente cooperativa e auto-organizável, como demonstram estudos de re-associação [3,18], apresentando grande estabilidade redox, sendo inclusive protótipo para o desenvolvimento de substitutos sanguíneos, ou seja, de sangue artificial [19]. A grande estabilidade redox representa um importante fator no que se refere à estocagem da hemoglobina por períodos prolongados. Estudos mostram que estas proteínas podem ser estocadas por longos períodos, em torno de seis meses a um ano, sem que sua capacidade de transporte de oxigênio seja afetada, por exemplo, pela oxidação com a produção de meta-hemoglobina [20,21].

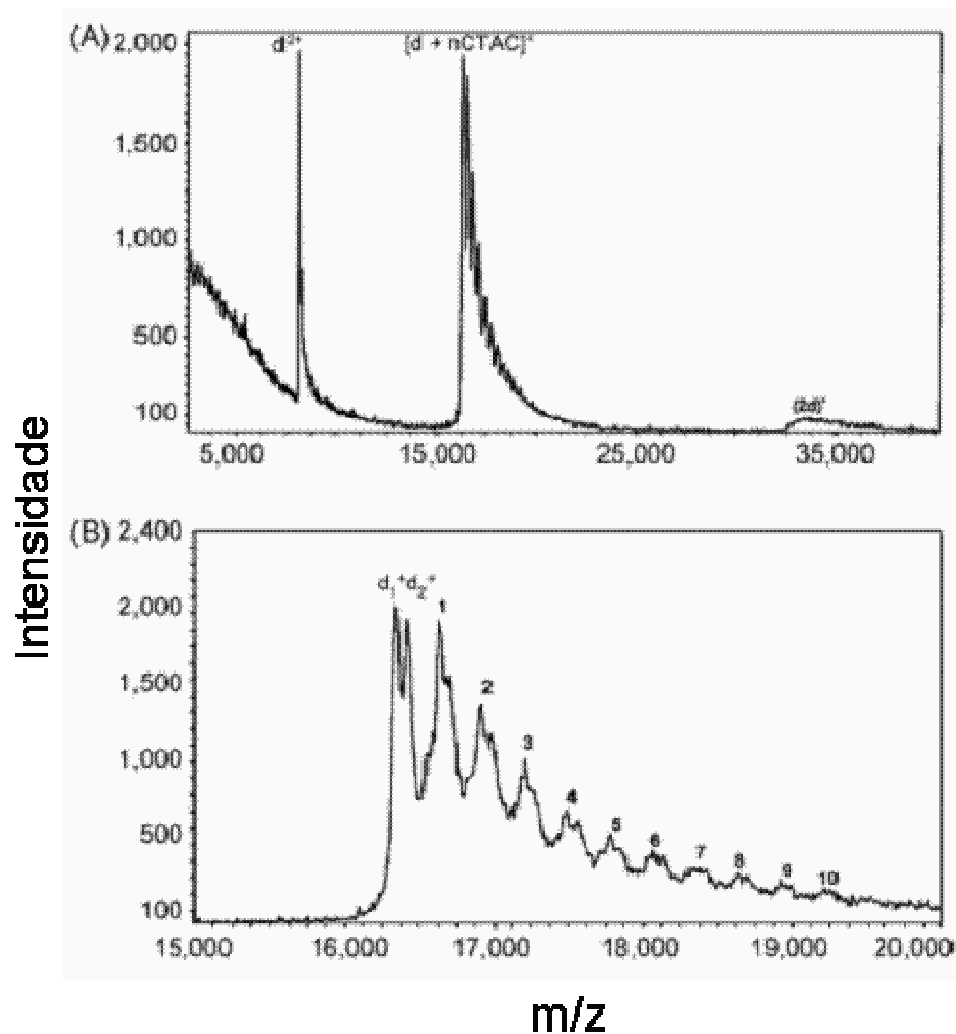
A estrutura oligomérica e propriedades espectroscópicas da HbGp vem sendo estudadas há alguns anos no laboratório de Biofísica Molecular. Este grupo tem proporcionado nos últimos anos uma contribuição significativa no estudo de hemoglobina extracelular, mais especificamente, da HbGp [21-23]. A interação da HbGp com surfactantes iônicos apresenta uma abordagem interessante, e de grande

---

relevância, uma vez que os surfactantes são largamente empregados em bioquímica e biotecnologia para a solubilização protéica, purificação, caracterização e determinação de estrutura de algumas proteínas [24]. Desta forma, a interação com surfactantes, em várias faixas de concentração, proporciona informação significativa a respeito do arranjo estrutural, oligomérico da proteína.

Estudos com o surfactante aniônico, dodecilsulfato de sódio (SDS), mostraram que inicialmente ocorre à dissociação da macroproteína em concentrações acima da concentração micelar crítica (cmc) [25]. Estudos espectroscópicos do efeito do surfactante catiônico, cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), mostraram que para a HbGp na presença de CTAC, na faixa de concentração entre 0,1 e 1 mM, ocorre a precipitação da proteína, seguida de redissolução dos agregados em concentrações maiores de surfactante catiônico [20]. Os efeitos dos surfactantes aniônico (SDS) e catiônico (CTAC) em pH 7,0 e 9,0 são diferentes, uma vez que o primeiro induz dissociação, enquanto que o segundo induz, em baixas concentrações, também algum tipo de agregação, conforme demonstram os estudos espectroscópicos [20, 25]. Estudos de MALDI-TOF-MS do monômero *d* na presença de CTAC, no pH 7,0 mostram a interação deste surfactante com a estrutura da proteína. Na (Figura 08) observa-se que o desdobramento do pico corresponde ao monômero *d* devido à interação com CTAC.





**Figura 8:** Análise do espectro de MALDI-TOF-MS do monômero d puro isolado, obtido a partir da oxi-HbGp nativa através de cromatografia numa coluna de Sephadex G-200 em pH 9,0, na presença de 0,2 mM CTAC e razão amostra / matriz de 1:10: (espectro A); (B) a região expandida de massas de 15.000 a 20.000 Da para o monômero d monoprotonado  $d^+$ , mostrando a interação CTAC [16,17].

Mais recentemente, foram realizados estudos como surfactante zwitteriônico, N-hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato (HPS) [23], sendo observado que a presença do HPS favorece a dissociação da proteína, bem como a sua auto-oxidação.

---

Entretanto, a interação do HPS com a HbGp foi claramente menor do que a interação desta hemoglobina com os surfactantes catiônico, CTAC, e o aniônico, SDS. Provavelmente, esta menor interação da HbGp com o HPS é devido a menor interação eletrostática entre o HPS e os sítios iônicos da proteína bem como ao menor valor de cmc (concentração micelar crítica) do HPS [21-23].

O efeito dos surfactantes CTAC e SDS na estrutura oligomérica da HbGp também foi estudado por meio de MALDI-TOF-MS [24]. Neste trabalho foi observada a interação efetiva do surfactante catiônico CTAC com as duas isoformas do monômero **d**, **d<sub>1</sub>** e **d<sub>2</sub>**, onde até 10 moléculas de CTAC podem ligar-se a cada isoforma. Diferentemente do CTAC, o espectro de massas obtido para o sistema SDS-HbGp mostrou que a adição do surfactante aniônico SDS não origina um aumento de massa tão significativo das isoformas monoméricas, indicando que a interação SDS-HbGp é, provavelmente, menor quando comparada com a interação CTAC-HbGp [24]. O pI ácido da proteína em torno de 5,5 é, provavelmente, responsável por este comportamento. Estes dados são consistentes com os estudos espectroscópicos publicados recentemente, onde foi observado uma forte interação entre o CTAC e HbGp em pH fisiológico [25].

Estudos espectroscópicos da HbGp mostraram que a proteína oligomérica encontra-se dissociada em pH alcalino [26-27]. Através da técnica de DLS foi determinado um diâmetro hidrodinâmico  $D_h$  de 27 nm em pH 7,0 que estar associado a proteína na sua forma íntegra, enquanto que em pH 9,0 um  $D_h$  de 10 nm é observado, mostrando que a proteína está na sua forma dissociada [20].

---

Trabalhos anteriores utilizando como ferramenta principal as espectroscopias de fluorescência e de absorção ótica no uv-vísivel indicam que a dissociação alcalina depende fortemente do estado de oxidação do heme, sendo incompleta para a hemoglobina reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ), completa na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e novamente incompleta na presença de cianeto [28-29]. A estrutura oligomérica da oxi-HbGp em pH alcalino foi estudada por Imasato e colaboradores [29], onde foi proposto que em pH 9,0, ocorre a dissociação da espécie oxi-HbGp em dímeros de tetrâmeros  $(abcd)_2$ , trímeros  $(abc)$ , monômeros  $d$  e cadeias *linkers*. Estudos da hemoglobina na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [27,28] demonstram que esta espécie, em meio alcalino, sofre completa dissociação em trímeros e monômeros, sugerindo que a hemoglobina na forma oxidada é menos estável em relação ao arranjo oligomérico quando comparada com a espécie oxi-HbGp, isto é, a oxidação da proteína favorece a sua dissociação oligomérica. Um trabalho posterior complementa e evidencia o efeito da auto-oxidação na dissociação da proteína [22].

Zhu e colaboradores [18] estudaram a estrutura oligomérica da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* e também observaram que a associação e a dissociação das subunidades dependem do estado de oxidação. Particularmente, a oxidação do complexo  $(abcd)_4$  com ferricianeto causa completa dissociação em monômeros  $d$  e trímeros  $abc$ , mas a adição de cianeto de potássio (KCN) mantém o complexo  $(abcd)_4$  ou favorece a re-associação das subunidades oxidadas. Esta constatação ressalta a ação efetiva do cianeto nas hemoglobinas gigantes, além de evidenciar a correlação entre as modificações do estado de oxidação do grupo heme com as alterações das

---

interações entre as cadeias polipeptídicas, responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica.

Muitos estudos sobre a estabilidade e da estrutura oligomérica de diferentes proteínas gigantes como a HbGp [16,22,24], HbLt [10,18] e hemoglobina de *Arenicola marina* [2] estão sendo realizados por diferentes grupos de pesquisas, por meio de mudanças na composição do meio, assim como, variação do pH, presença de sais variação de temperatura, uréia e cloreto de guanidina. Processos de dissociação e re-associação da HbLt tem sido investigados, porém muitas questões relacionadas aos mecanismos de dissociação e re-associação permanecem não esclarecidas [18,30].

Há um grande interesse em entender os processos de dissociação e associação desta classe de hemoglobinas, uma vez que estes estudos podem fornecer informações úteis sobre as interações entre as subunidades que são necessárias para manter a estrutura quaternária. Além disso, como estas hemoglobinas extracelulares constituem-se numa classe de proteínas que podem representar uma proposta interessante de um sistema modelo para desenvolver substitutos terapêuticos de sangue [14], um estudo detalhado das interações das subunidades faz-se necessário para identificar uma composição ideal de armazenamento [2].

---

### 1.3. Desnaturação de proteínas

As proteínas apresentam uma estrutura tridimensional correspondente à sua conformação nativa, em consequência de um equilíbrio de forças entre as diversas subunidades da proteína e o solvente [7,31,32]. A desnaturação de proteína envolve a perturbação das forças que estabilizam a conformação nativa, quebrando e reorganizando ligações não covalentes, levando à modificação nas estruturas secundária, terciária, e quaternária da proteína [23,18,32], com uma perda irreversível de atividade produzindo o seu desenovelamento (“unfolding”). Entre os efeitos mais comuns que induzem a desnaturação de proteína temos: aumento da temperatura acima de um limite, variação da constante dielétrica do meio em presença de solventes orgânicos, mudanças drásticas do pH e agentes químicos específicos que levam a ruptura da conformação nativa, como por exemplo, a uréia e o cloreto de guanidina (GdmHCl) [20,22, 25,31,33].

Há muitas propriedades das proteínas que se modificam durante o processo de desnaturação, e, conseqüentemente, várias técnicas podem ser convenientes para estudar esse fenômeno. Muitas delas são baseadas em estudos espectroscópicos, calorimétricos, bem como medidas hidrodinâmicas [22,25].

Intensidades espectroscópicas de emissão de fluorescência e de absorção ótica fornecem informações de mudanças estruturais ao redor do grupo do cromóforo ou fluoróforo. Métodos espectroscópicos são indispensáveis no estudo de soluções de

---

proteínas devido a sua versatilidade, sensibilidade, resolução temporal, e aplicabilidade bastante ampla [26,29].

Entretanto, as análises espectroscópicas podem deixar lacunas no que se refere aos estudos de mudanças estruturais. Para uma compreensão mais completa da natureza da estabilidade da estrutura das proteínas, pode ser muito informativo investigar o mesmo processo de desnaturação usando outras propriedades físico-químicas baseadas em diversas técnicas experimentais. Em particular, o acompanhamento da estrutura global da proteína durante o processo de desnaturação, a sua dissociação podem fornecer um entendimento mais profundo da interação proteína-proteína.

Alguns trabalhos na literatura têm reportado o efeito da desnaturação na estrutura secundária e terciária das proteínas, assim como mudanças no tamanho e forma das hemoproteínas [34,35]. Foi observado através da técnica de DLS que a HbGp, em pH 7,0, acima de 52 °C, desnatura-se aumentando o tamanho da partícula, de 27 nm para 65 nm [20]. A proteína em pH 7,0 em 25 °C é estável, não modificando o seu diâmetro hidrodinâmico,  $D_h$ , de 27 nm por um longo período de tempo (72 hs). Para valores de pH acima de 9,0, foi observado o processo de dissociação da proteína, resultando numa partícula de  $D_h$  de 10 nm, o que está de acordo com a literatura que associa esta dimensão ao dodecâmero ((**abcd**)<sub>3</sub>, [36]). O dodecâmero originado na dissociação alcalina da HbLt possui  $D_h=10$  nm [36]. O efeito da temperatura em função do pH da HbGp também foi estudado, em valores de pH acima de 7,0, mostrando que o

---

aquecimento provoca inicialmente a dissociação, seguida pela desnaturação da proteína [22].

Em outros trabalhos foi demonstrado que o aquecimento da lisozima acima de 50 °C, no pH 1,0, aumentou a tensão superficial na interface ar-líquido e a intensidade de espalhamento [37,38]. O comportamento de várias proteínas na presença de uréia e guanidina vêm sendo estudado. A dissociação da oxi-HbLt em pH neutro na presença de uréia e sais de Gdm (Guanidina) em concentrações que não causam a desnaturação das subunidades, forneceram um complexo de dodecâmero de 213 kDa, formado pelo trímero **abc** e o monômero **d** [35,39].

É interessante destacar também que a desnaturação de proteínas acontece, em geral, numa concentração muito menor de surfactante na faixa milimolar quando comparada à concentração necessária de outros agentes químicos desnaturantes, comumente utilizados, tais como uréia (6 - 8 M) e guanidina (4-6M).

Além do fenômeno de desnaturação, o estudo da re-associação de proteínas pode trazer também informações relevantes. Um trabalho realizado por Vinogradov e colaboradores da HbLt [30], mostrou que a proteína após sofrer processos de dissociação pode se re-associar na presença de dications ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) alcançando até cerca de 30% da estrutura oligomérica. Entretanto, ainda permanece não esclarecido se as espécies re-associadas podem apresentar a mesma atividade da proteína nativa. Para estudar a re-associação de proteínas, um dos requisitos principais é que as mesmas não tenham sofrido o processo de desnaturação. Por isso, alguns

---

pesquisadores para provocar uma dissociação inicial na proteína, sem levar à desnaturação, utilizam a aplicação de pressão hidrostática [25,26], presença de agentes desnaturantes em baixa concentração (menor do que 2 M, no caso de uréia) [33] ou mesmo aceleram processos de oxidação adicionando agentes oxidantes [23].



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho propôs determinar a MM do oligômero e das subunidades da HbGp em pH neutro e alcalino, e o estudo da estabilidade da proteína nativa frente aos processos de dissociação oligomérica, oxidação do heme e desnaturação da HbGp. Estes estudos permitiram avaliar a MM do oligômero, possibilitando a compreensão da estequiometria das subunidades da proteína e sua estabilidade em diferentes condições.

Considerando que a dissociação alcalina leva à formação de subunidades em solução dependentes do estado de oxidação do ferro, este estudo tem por objetivo avaliar também o efeito desta dissociação na estrutura terciária das partículas em solução.

## 2.2. Objetivos específicos

- 1) Através de ultracentrifugação analítica, AUC determinar o valor da massa molecular da hemoglobina gigante extracelular, HbGp, na sua forma íntegra, em pH neutro e em dois estados de oxidação do ferro do heme: oxi- e cianometa-HbGp.
- 2) O mesmo estudo foi realizado em relação às suas subunidades, em condições de equilíbrio no meio alcalino e para o monômero d na forma isolada em pH neutro e alcalino.
- 3) Estudar a estabilidade das formas oxi- e cianometa-HbGp em meio alcalino.
- 4) Estudar a estabilidade da HbGp nas três formas da HbGp: oxi-, meta e cianometa em meio ácido.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Extração e purificação da HbGp

A hemoglobina extracelular em estudo é extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* “minhoca” pertencente ao filo Anelídea, à classe Oligochaeta e à família *Glossoscolecidae*. As características físicas de cada espécime limitam-se a um comprimento que varia de 280 a 305 mm, diâmetro de 10 a 11 mm e massa aproximada de 15 g.

A HbGp foi preparada utilizando sangue fresco de minhocas da espécie *Glossoscolex paulistus*, como reportado na literatura [27,28]. A hemoglobina foi extraída anestesiando cada animal com éter dietílico por um período de 15 a 20 min. Foi feita uma incisão na parte superior do animal, numa região próxima a cabeça para evitar as enzimas digestivas, sendo o sangue coletado com uma Pipeta Pasteur até o esgotamento do animal. É adicionado a hemolifa anticoagulante, Citrato de Sódio 0,1 mol/L, e mantida em gelo até o término da extração.

Posteriormente a esta etapa inicial a amostra estoque da oxi-HbGp é centrifugada a 4 °C (5000 rpm por 15 min) para eliminar restos de células e resíduos, seguida por uma ultrafiltração (peso molecular de corte de 30 kDa) e ultracentrifugação

---

em 250.000 g a 4 °C por 6 h. A proteína foi obtida em forma de (pellet), sedimentação no fundo do tubo, sendo ressuspensa em um alíquota mínima, em torno de 8 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0, e armazenado a 4 °C na geladeira. Posteriormente 1 mL de sangue é purificada numa coluna de Sephadex G-200 equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0. Este procedimento é realizado até que toda a hemolifa ressuspensa seja filtrada. Todas as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente utilizando os coeficientes de extinção molar  $\epsilon_{415\text{nm}} = 5,5 \pm 0,8 \text{ (mg / ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para oxi-HbGp,  $\epsilon_{420\text{nm}} = 4,8 \pm 0,6 \text{ (mg / ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para cianometa-HbGp e  $\epsilon_{403\text{nm}} = 4,1 \pm 0,7 \text{ (mg / ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para meta-HbGp [25,26].

### **3.2. Medidas de Ultracentrifugação Analítica - Velocidade de Sedimentação (SV)**

#### **3.2.1. Preparação das amostras da Oxi-HbGp, cianometa-HbGp e monômero *d***

##### **3.2.1.a – Oxi- HbGp**

As amostras da hemoglobina na forma oxi foram preparadas em tampão Tris – HCl 100 mmol/L + 50 mmol/L NaCl, pH 7,0 e 10,0 a partir de um estoque concentrado de proteína previamente purificado. Uma alíquota de proteína foi preparada na concentração de 600 µg/mL, e dialisada separadamente por 48 h contra tampão Tris –

---

HCl 100 mmol/L + 50 mmol/L NaCl, pH 7,0 e 10,0. Neste intervalo de tempo o tampão de diálise foi substituído quatro vezes sendo a última alíquota reservada para ser utilizada como amostra de referência.

A partir dos estoques nos pH 7,0 e 10,0, foram realizadas as devidas diluições a fim de preparar-se seis amostras, cujas concentrações finais foram 100, 200 e 300 µg/mL e volume de 1,5 mL, nos respectivos pHs.

Após a diálise os espectros de absorção foram medidos para as três amostras, a fim de se ter um bom controle das respectivas concentrações.

Um conjunto adicional de três amostras nas mesmas concentrações descritas acima (100, 200 e 300 µg/mL) e no pH 10 foi preparado, no qual foi adicionado em cada amostra 5 mM de β-mercaptoethanol. As proteínas utilizadas nestes experimentos foram de tempos de estocagem diferentes, onde foram medidas amostra de 0, 6 e 12 meses de estocagem. Além disso, todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### **3.2.1.b – Cianometa-HbGp**

Para preparar a cianometa-HbGp, primeiramente obteve-se a proteína no estado oxidado, ou seja, na forma meta-HbGp [28]. A obtenção da meta-HbGp é feita por meio da oxidação da oxi-HbGp com a adição de ferricianeto de potássio,  $K_3[Fe(CN)_6]$ , na razão de cinco vezes a concentração de heme. O excesso de

---

ferricianeto de potássio é importante para assegurar que todos os átomos de ferros sejam oxidados. Transcorrido 30 min adiciona-se cianeto de potássio KCN, em uma razão de cinco vezes a concentração do heme deixando interagir a mistura por 1 hora a fim de se obter a cianometa-HbGp. O excesso de reagente é retirado através de diálise por 2 h a 22 °C.

Após o preparo da solução estoque na forma cianometa, foi realizado o mesmo procedimento para o preparo das soluções na forma oxi.

### **3.2.1.c – HbGp (monômero d)**

A partir de um estoque concentrado de proteína na forma oxi, foi preparado uma solução em tampão Tris-HCl 100 mmol/L, pH 10,7, de concentração e volume finais de 6 mg/mL e 1000 µL, respectivamente. Posteriormente o pH da solução foi verificado e ajustado para 9,3, e em seguida a amostra permaneceu em repouso por 24 h a temperatura constante de 22 °C. Depois de transcorrido este tempo a amostra foi aplicada em uma coluna cromatográfica de filtração em gel Sephadex G-200 de 100 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro equilibrada em tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0, sendo que o pH da amostra verificado antes da aplicação na coluna.

As frações coletadas foram posteriormente analisadas espectrofotometricamente nos comprimentos de ondas 280 e 415 nm, a fim de

---

identificar a espécie monomérica, através de uma análise do cromatograma. Este cromatograma é elaborado a partir dos dados da absorbância coletado para cada fração em função do volume.

A partir das frações obtidas da cromatografia de gel filtração juntou-se as frações dos picos cromatográficos correspondentes a proteína na forma monomérica em um tubo de ensaio; essa fração foi concentrada por filtração em uma centrífuga a 6000 rpm por 3 min. Após o preparo da amostra, esta foi colocada para dialisar contra tampão tris-HCl 100 mmol/L + NaCl 50 mmol/L pH 7,0 e 10,0, durante 48 h. O tampão foi trocado 4 vezes durante este intervalo, sendo o último tampão da diálise reservado para ser utilizado como branco nas medidas de ultracentrifugação analítica.

Após a diálise foram preparadas amostras em tampão Tris-HCl pH 7,0 e 10,0 do monômero nas concentração: 40, 80 e 130  $\mu\text{g/mL}$ , e volume final de 600, 600 e 800  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Nestas medidas foi utilizada uma ultracentrifuga analítica da Beckman Coulter, modelo XL-A. As medidas foram realizadas em corridas de 12 h e monitoradas em dois comprimentos de onda, em 236 e 420 nm à 20 °C.

---

### **3.3. Medidas de Fluorescência e espalhamento de luz**

#### **3.3.1. Preparação das amostras nas formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp em diferentes valores de pH para medidas de fluorescência e espalhamento.**

Foram preparadas diferentes amostras da oxi-HbGp de concentração 100 µg/mL em tampão misto acetato-fosfato 20 mM em diferentes valores de pH, a partir de um estoque concentrado de proteína 10 mg/mL. Posteriormente foi acertado o pH das amostras, pela adição de alíquotas de estoques diluídos de solução de HCl, para uma faixa de pH de 4,0 a 7,0. Após uma hora e meia interagindo a uma temperatura de 25 °C, as medidas foram realizadas.

A proteína na forma oxidada (meta) foi preparada a partir de um estoque concentrado de proteína na forma nativa, ou seja, oxi-HbGp por meio da adição do agente oxidante ferricianeto de potássio,  $K_3[Fe(CN)_6]$ , na razão de cinco vezes a concentração de heme. Posteriormente foi feita diálise do estoque concentrado de meta para retirar o excesso de sal da amostra. A cianometa-HbGp é obtida de forma semelhante a partir de um estoque da proteína na forma meta, ou seja, além da adição do ferricianeto de potássio é adicionado na mesma proporção, o cianeto de potássio KCN. Depois de interagir por alguns minutos o estoque é dialisado, para remover o excesso de sal.



---

As amostras na concentração mais baixa na qual é realizado as medidas, ou seja, 100 µg/mL para as formas, cianometá- e meta-HbGp, são obtidas através do mesmo procedimento utilizado para a oxi-HbGp.

As medidas de espalhamento de luz e emissão de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro modelo F4500 da HITACHI em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm, sendo todas as medidas realizadas a 22 °C. As medidas de espalhamento de luz no fluorímetro foram feitas com ganhos de 400 e 700 V e fendas de emissão e excitação de 2,5 e 5,0 nm, com excitação e emissão no mesmo comprimento de onda de 350 nm. As medidas de emissão de fluorescência foram obtidas em 280 e 295 nm, sendo os espectros de emissão monitorados na faixa de 290 – 450 nm e 305 – 450 nm, respectivamente.

## 4. Técnicas de estudo

### 4.1. Ultracentrifugação Analítica (AUC)

A técnica de ultracentrifugação analítica, AUC, é uma ferramenta poderosa para estudar o comportamento de macromoléculas biológicas, sendo atualmente bastante utilizada no estudo de proteínas, carboidratos e polímeros [40]. Através desta técnica é possível determinar a massa molecular (MM) da macromolécula e obter informações sobre a heterogeneidade do sistema em relação à sua MM, ou seja, de quantas subunidades o sistema é formado e qual a proporção entre elas [41]. Esta técnica pode também ajudar a determinar se a macromolécula forma agregados e se estes são reversíveis ou irreversíveis [42].

Esta técnica é uma ferramenta importante em muitas áreas tradicionais da bioquímica, polímeros sintéticos, biologia molecular, interações de proteína, como também tem sido empregada em outras áreas, mais recentemente, como, a química supramolecular, a caracterização de nanopartículas e biomateriais [43], e no desenvolvimento de condições para aprimoramento da indústria farmacêutica [40].

Na última década tem aumentando o potencial computacional de análise de dados, em especial, a análise matemática detalhada da sedimentação tem gerado um

---

ressurgimento no interesse por esta técnica e no desenvolvimento de novas aplicações [44].

Embora, a ultracentrifugação analítica AUC desempenhou um papel notável na história da caracterização de proteínas e complexos, esta metodologia sofreu um declínio por muitos anos, em grande parte devido à falta de novos instrumentos modernos que facilitem a coleta de dados [45]. Felizmente, este problema foi solucionado nas últimas décadas, com o avanço da informática, sendo que esta técnica foi transformada pela combinação de novos e importantes “softwares” computacionais para a análise de dados, permitindo o uso de novas abordagens para a determinação dos coeficientes de sedimentação e deconvolução dos dados experimentais, entre outros [40]. Esta técnica é considerada uma técnica absoluta por não requerer a calibração no processo de análise, o que elimina erros oriundos deste tipo de procedimento analítico.

A técnica de ultracentrifugação analítica foi proposta e usada pela primeira vez por Svedberg, onde foi aplicada para demonstrar a homogeneidade de sistemas de elevada massa molecular, provando assim a existência das macromoléculas [ 46,47].

Uma partícula em solução está em constante movimento aleatório que é chamado de movimento Browniano [47]. A energia cinética envolvida nos “encontros Brownianos” entre partículas origina dois tipos de movimentos característicos das moléculas em solução: a difusão translacional e a difusão rotacional que representam o movimento das partículas na solução e a rotação da partícula em torno do seu próprio

---

eixo, respectivamente. A força cinética da partícula em solução encontra uma força de resistência chamada de Força friccional ( $F_f$ ) que depende da sua velocidade e de uma constante relacionada à sua forma e tamanho: o coeficiente friccional ( $f$ ) sendo que este parâmetro depende da viscosidade da solução [40,48].

Na ausência de uma força externa e se a massa ( $m$ ) da partícula for desprezível para sedimentar pela ação da gravidade, as duas forças vetoriais se anulam resultando num movimento aleatório denominado de difusão. O coeficiente de difusão ( $D$ ) quantifica a velocidade da partícula no meio, considerando uma área em função do tempo [40,49].

Segundo Einstein, o  $D$  está relacionado à temperatura absoluta ( $T$ ), à constante dos gases ( $R$ ), ao número de Avogrado ( $N_{AV}$ ), à constante de Boltzmann ( $k_b$ ) e é inversamente proporcional ao  $f$  pela seguinte equação (01) [49]:

$$D = \frac{RT}{N_{AV}f} = \frac{k_b T}{f} \quad (\text{Equação 01})$$

Desta forma, partículas alongadas ou volumosas apresentam maior resistência a sedimentação devido que as mesmas apresentam maior fricção ou atrito no sistema e por isso caracterizam-se por um  $D$  menor do que partículas compactas ou esféricas [40,49]. O  $D$  pode ser facilmente medido experimentalmente a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz, DLS. O coeficiente friccional  $f$  de uma partícula está relacionado ao seu raio hidrodinâmico  $R_H$  (ou Raio de Stokes) e à viscosidade da solução  $\eta$  por meio da equação de Stokes, equação 02:

---

$$f = 6\pi\eta R_H \quad (\text{Equação 02})$$

Partindo da premissa que uma dada partícula seja esférica e compacta, e que esta simetria sofre a menor fricção de todas as formas possíveis, e conseqüentemente tem um maior coeficiente de difusão, podemos determinar o coeficiente friccional que é representado como  $f_0$ . O  $f_0$  pode ser calculado pela substituição do  $R_H$  na equação 02 pelo raio de uma esfera compacta e lisa ( $R_0$ ) que pode ser estimado pela equação (03) [40].

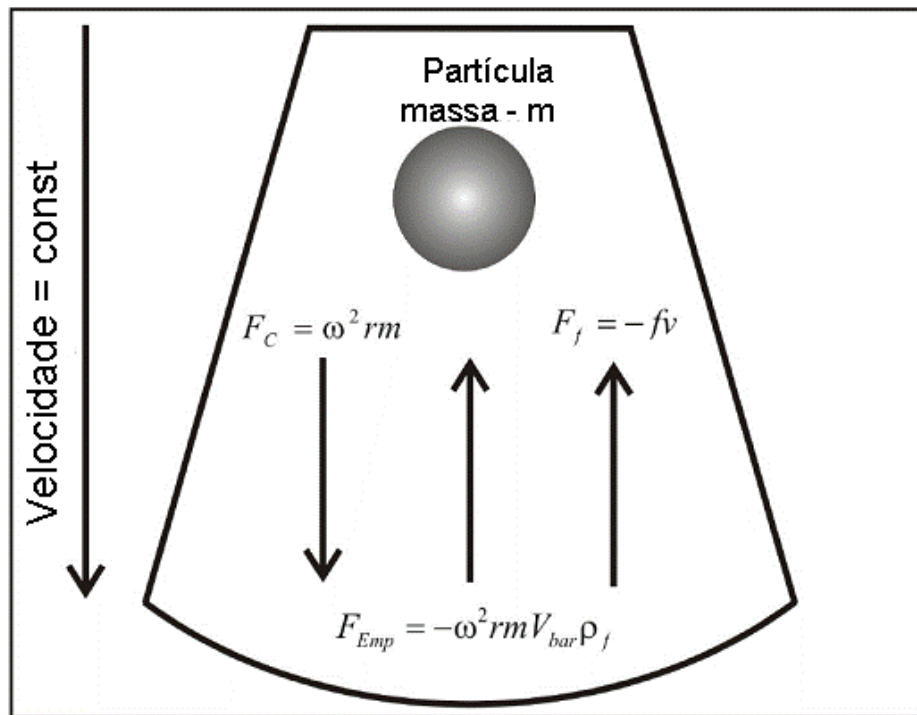
$$R_0 = \left( \frac{3MV_{bar}}{4\pi N_{AV}} \right)^{1/3} \quad (\text{Equação 03})$$

onde,  $V_{bar}$  é o volume parcial específico de uma partícula. Entretanto, na prática, as macromoléculas em solução são solvatadas e dinâmicas (tem movimento) e não são esféricas. Assim, a massa  $M$  determinada usando técnicas tais como a cromatografia de exclusão molecular e o *DLS* estão relacionados ao  $R_H$  da partícula através da equação 03 que é uma indicação do tamanho “aparente” dessa proteína dinâmica solvatada. Uma proteína monomérica, porém assimétrica, apresentará um  $R_H$  superior ao calculado para a mesma proteína globular e pode erroneamente sugerir, em alguns casos, que ela seria um dímero aparente [40,49,50]. Conhecendo-se o  $f$  experimental de uma partícula, é possível avaliar se ela é uma partícula esférica ou globular através da razão do  $f$  pelo  $f_0$  conhecido como razão friccional ( $f/f_0$ ). O  $f/f_0$  pode ser calculado indiretamente usando o  $R_H$  através da equação 04 [51]:

$$\frac{f}{f_0} = \frac{6\pi\eta R_H}{6\pi\eta R_0} = \left( \frac{4\pi N_{AV}}{3} \right)^{1/3} R_H (MV_{bar})^{-1/3} \quad (\text{Equação 04})$$

Partículas com formatos diferentes ao de uma esfera compacta e lisa (partículas oblatas, prolatas, etc), considerando uma relação do tipo comprimento a *versus* altura b, a/b, mas de mesma MM, apresentarão um  $f/f_0$  maior do que 1. Por outro lado, uma proteína globular apresentará o valor de  $f/f_0$  próximo a 1. Desta forma, a determinação do  $f/f_0$  é uma importante ferramenta para o estudo da simetria e da estrutura de proteínas por técnicas hidrodinâmicas [40, 42; 47].

Sendo conhecidos alguns dos parâmetros importantes comuns a partículas em solução podemos avaliar as forças que atuam em uma dada partícula de MM, quando exposta a um campo de força centrífuga alto. A Figura 09 mostra três forças que atuam em uma partícula de massa M em solução. A força centrípeta,  $F_c$ , é uma força que favorece a sedimentação sendo proporcional à velocidade angular ( $\omega$ ). Duas outras forças opostas a esta força atuam no sistema, a força de empuxo  $F_{Emp}$ , que depende apenas do volume parcial específico  $V_{bar}$  e da densidade da partícula ( $\rho$ ) e a força friccional  $F_f$  que está estritamente relacionada ao formato da partícula [ 42,47], e depende da velocidade da partícula e do coeficiente friccional.



**Figura 9:** Forças que atuam em uma partícula em solução.  $F_f$  - Força friccional,  $F_c$  - Força centrípeta e  $F_{Emp}$  - Força de empuxo.

Quando em um sistema a velocidade angular,  $\omega$ , é constante as forças que atuam no sistema se anulam ( $F_c + F_{Emp} + F_f = 0$ ) e a velocidade de sedimentação da partícula pode ser definida pela equação 5 [52].

$$v = \frac{[\omega^2 r m (1 - V_{bar} \rho)]}{f} \quad (\text{Equação 05})$$

Como a massa de uma partícula é ( $m = M/N_{Av}$ ), podemos reorganizar a equação acima em função de  $v$ ,  $\omega$  e  $r$  a fim de chegarmos a equação de Svedberg, equação 6 [40,52].

$$\frac{M(1 - V_{bar}\rho)}{N_{AV}f} = \frac{v}{\omega^2 r} = s \quad (\text{Equação 06})$$

Onde,  $v/\omega^2 r = s$  é comumente conhecido como coeficiente de sedimentação. Portanto, a partir de experimentos de ultracentrifugação analítica podemos obter parâmetros de partículas, tais como  $s$ ,  $D$  e  $f$ . Os fatores complicadores na análise de dados de AUC são a polidispersidade de espécies ou a possível presença de mais de uma espécie em solução nas condições estudadas [52].

A partir das equações 1 e 6 podemos obter uma equação que relaciona os parâmetros  $s$ ,  $D$  e  $M$ , como a equação 7, conhecida como a equação de Svedberg-Einstein.

$$M = \frac{sRT}{D(1 - V_{bar}\rho)} \quad (\text{Equação 07})$$

Como podemos observar na equação 07, por meio da técnica de ultracentrifugação analítica é possível determinar valores precisos de massa de macromoléculas, pois há uma relação direta entre este parâmetro e o  $s$  (coeficiente de sedimentação) e a massa molecular da partícula [40]. Além disso, também é possível obter informações importantes sobre a forma e a simetria das proteínas em solução através da razão friccional  $f/f_0$ .

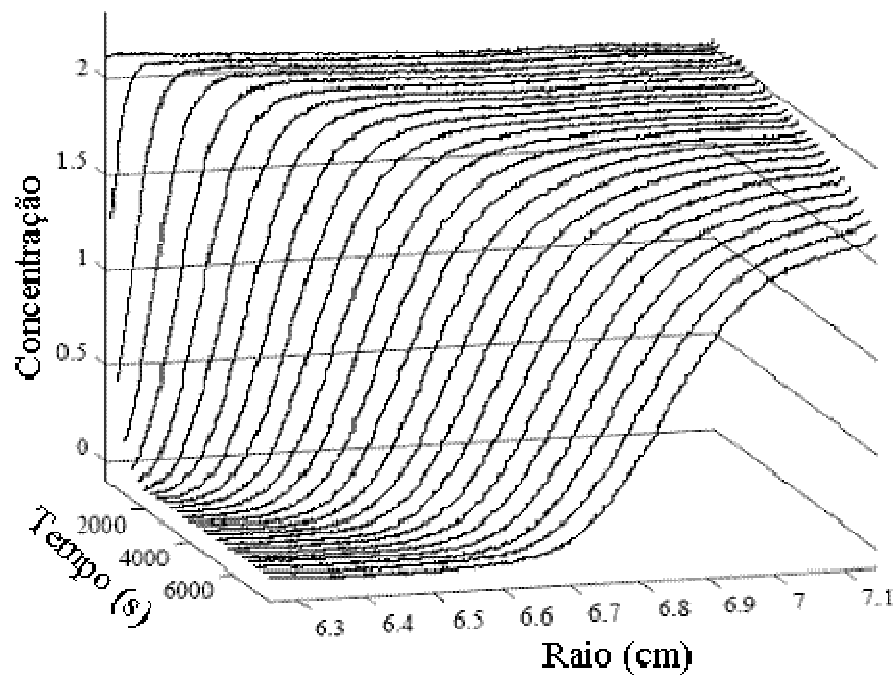
Atualmente existem basicamente dois tipos principais de metodologias utilizadas na ultracentrifugação analítica: velocidade de sedimentação  $SV$  e



---

sedimentação em equilíbrio SE. O método de SV baseia-se na sedimentação controlada de macropartículas por meio do uso de altas velocidades, enquanto que a SE está fundamentada em princípios termodinâmicos, sendo a mesma sensível à MM da partícula e não a forma da macromolécula. Por este motivo o emprego de, SE, torna possível obter informação da massa da proteína, independente da forma da partícula estudada. Normalmente quando uma amostra tem elevada heterogeneidade com espécies com coeficientes de sedimentação muito próximos, a análise dos dados de SV torna-se um trabalho bastante árduo. No entanto, existem metodologias desenvolvidas recentemente e que permitem uma boa avaliação destes casos [40,44, 45].

Na ultracentrifugação analítica o método de velocidade de sedimentação (SV) e sedimentação (SE) utiliza um sistema óptico, que permite o acompanhamento da evolução dos gradientes de concentração das macromoléculas na solução causada pela aplicação de uma força gravitacional [44]. A sedimentação, ou melhor, o deslocamento da proteína durante o processo é analisado por meio de medida de absorvância ou de índices de refração, em comprimentos de ondas específicos em função do tempo [40]. A aplicação de uma força centrífuga provoca o esgotamento das macromoléculas no menisco e a formação de uma concentração que se move para o limite inferior de posição da amostra como mostra a (Figura 10).



**Figura 10:** Gráfico do perfil da concentração versus tempo e distância radial.

Os comprimentos de onda mais comuns nas análises são na região que as ligações peptídicas absorvem (210 - 230 nm), em 280nm para os resíduos dos aminoácidos aromáticos e na região da banda de Soret para hemoproteínas entre 403 a 420 nm. À medida que a proteína sedimenta a fronteira entre as partes que contém proteína e a parte que contém apenas solvente migra em direção ao fundo da coluna, provocando uma variação na concentração da amostra. Esta diferença de concentração em função do tempo é registrada como uma diferença de absorção (Figura 10).

É possível obter informações quantitativas utilizando programas computacionais específicos como, por exemplo, o SEDFIT [53] sobre a forma da partícula através da relação entre o coeficiente de sedimentação,  $s$ , Figura 06, o coeficiente de difusão,  $D$ , e

o coeficiente friccional,  $f$ . Informações sobre a termodinâmica de um sistema associativo também podem ser obtidas uma vez que é possível avaliar a estequiometria e a constante de equilíbrio, envolvidas no processo. Além disso, estas informações podem ser obtidas em função de alterações provocadas no meio, por exemplo, alterando o pH, a temperatura, adicionando diferentes ligantes, etc. Várias revisões detalhadas foram produzidas e estão disponíveis [40,42,47,53]. Desta forma, a AUC foi bastante útil na determinação da MM da HbGp e também de suas subunidades.

Os dados de ultracentrifugação analítica são medidos em perfis de concentração na direção radial como uma função do tempo, (Figura 10). Assim, conceitualmente a determinação mais simples do coeficiente de sedimentação de uma macromolécula é baseada na formação de uma fronteira de sedimentação em um campo centrífugo alto, onde o valor  $s$  pode ser determinado, por exemplo, como o deslocamento médio da fronteira de sedimentação, (Figura 10) [38]. No entanto, este método é principalmente de relevância histórica, pois o surgimento de técnicas modernas computacionais permitiram muitas abordagens, tais como a modelagem de dados por meio da equação 08 (a equação de Lamm) [ 49, 54 - 57]:

$$\frac{\partial \chi(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ rD \frac{\partial \chi(r,t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 \chi(r,t) \right] \quad \text{Equação 08}$$

A Equação 8 descreve a variação da concentração de espécies macromoléculas como uma função do tempo e da posição radial sob a influência da sedimentação e da difusão na célula. A migração e difusão de uma solução diluída de

---

partículas monodispersas com concentração  $\chi(r, t)$  em um setor da célula sobre a influência do campo centrífugo gerada em um rotor com velocidade angular  $\omega$ .  $s$  e  $D$  são os coeficientes de sedimentação e difusão da partícula, respectivamente [49,54]. Eles são fortemente dependentes da massa molar, e estão relacionados pela equação de Svedberg, equação 07. A sedimentação em equilíbrio está baseada na equação de Lamm, onde por meio deste método é possível determinar a massa molecular de macromoléculas com grande exatidão, pois os efeitos de forma não atuam nesta metodologia [40].

#### 4.2. Tratamento dos dados de Ultracentrifugação analítica

Recentemente métodos matemáticos para resolver a equação 08 foram descritos e incorporados no programa computacional SEDFIT, versão 9.4 [40,57]. Diferentes formas de estimar a relação entre os coeficientes de sedimentação  $s$  e de difusão,  $D$ , para misturas de proteínas globulares estão disponíveis neste programa de análise. O modelo mais comum tem como base o peso médio das partículas em solução, onde o fator de forma  $a$ , razão friccional  $f/f_0$ , pode ser extraída dos dados experimentais. A conversão das curvas de distribuição  $c(s)$  em uma distribuição  $c(M)$  para cálculos da massa molar,  $M$ , é possível. Para os casos em que a massa molar das principais espécies é conhecida, este parâmetro pode ser utilizado como um conhecimento prévio para o cálculo de  $c(s)$ , sendo um parâmetro de normalização dos cálculos [40].

---

A análise de velocidade de sedimentação, SV de partículas com distribuições contínuas é complicada pelo fato que exige o conhecimento de pelo menos duas dependências funcionais. O ajuste da  $c$  (M) parâmetros de entrada como o coeficiente de sedimentação  $s$ , ou, de forma equivalente, o coeficiente de difusão  $D$ , portanto o tratamento de dados pelo SEDFIT versão 9.4 requer um conhecimento prévio de algumas propriedades hidrodinâmicas determinadas de forma independente [49].

O software SEDFIT (versão 9.4) foi utilizado para ajustar os dados de ultracentrifugação analítica. Este software trabalha a equação de Lamm modelando-a para discriminar a propagação da sedimentação na fronteira de difusão [49,57]. Este programa usa um valor fixo de coeficiente de difusão  $D$ , sendo que este parâmetro foi estimado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz DLS de forma independente e com alta resolução.

Uma propriedade importante intrínseca da HbGp que deve ser definida (ou estimada) é o volume parcial específico,  $V_{\text{bar}}$  que é o inverso da densidade das partículas. Normalmente  $V_{\text{bar}}$  pode ser estimado pela seqüência de aminoácidos. No entanto, a estrutura primária para todas as subunidades da HbGp não é conhecida e, portanto, a estimativa do  $V_{\text{bar}}$  baseada na seqüência de aminoácidos não é possível. Além disso, a estrutura oligomérica da HbGp é bastante complexa o que pode induzir erros na estimativa do  $V_{\text{bar}}$  a partir de sua seqüência de aminoácidos [58]. Este procedimento de estimar  $V_{\text{bar}}$  pela seqüência de aminoácidos foi realizado apenas para o monômero  $d$ , pois é a única subunidade cuja seqüência de aminoácidos é conhecida.

---

Assim, a propriedade  $V_{\text{bar}}$  para a HbGp foi estimada utilizando o software SEDFIT. Este programa pode fornecer um valor de  $V_{\text{bar}}$  como um fator de regularização na rotina de cálculo. Assim, primeiramente foi realizado um tratamento independente para estimar o  $V_{\text{bar}}$  da proteína. Depois que o  $V_{\text{bar}}$  foi estimado, o software SEDFIT foi utilizado para calcular os coeficientes de sedimentação pelas distribuições contínuas ( $c(s)$ ) e para avaliar a razão friccional,  $f/f_0$ , que é o parâmetro importante no processo de regularização e no entendimento da forma das partículas [49,57]. Os valores de  $s$  foram determinados como os valores máximos dos picos das curvas de  $c(s)$ , onde  $f/f_0$  foi permitida flutuar, ou seja, ficou livre, de modo que este parâmetro foi um fator de regularização (parâmetro ajustável) das curvas  $c(s)$ . O valor final de  $s$  é uma média entre os três conjuntos de dados obtidos experimentalmente, ou seja, para as três concentrações de proteínas estudadas. A análise das distribuições  $c(s)$  foi realizada assumindo a possibilidade da presença de várias espécies coexistente na solução em equilíbrio com diferentes coeficientes de sedimentação.

No tratamento dos dados da  $c(s)$  da HbGp foi observado um único pico, ou seja um único valor de  $s^*$  (experimental), para todos os dados analisados. Tratamentos adicionais foram feitos, assumindo a existência de uma única espécie, ou seja, foi utilizado um modelo discreto. Neste caso, o coeficiente de sedimentação,  $f/f_0$ , e a massa da proteína foram os parâmetros flutuantes no ajuste. O SEDFIT foi utilizado para estimar a MM da proteína, onde a mesma foi determinada como o valor máximo dos picos das curvas de  $c(M)$ . Para calcular as curvas  $c(M)$ , dois procedimentos foram utilizados: primeiramente o coeficiente de difusão  $D$  foi permitido a flutuar, sendo o

---

parâmetro de regularização do processo, e em um segundo tratamento a razão  $f/f_0$  foi o parâmetro variável [42,49,57].

O processo de análise descrito acima foi realizado para as amostras de baixa heterogeneidade, ou seja, oxi- e cianomet-HbGp no pH 7,0. Procedimento semelhante foi realizado para o monômero  $d$ , em ambos os valores de pH, pois esta amostra é obtida por gel sendo filtração bastante pura e com alta homogeneidade.

No entanto, o processo de análise para as amostras de HbGp em pH 10 difere do descrito acima. Em meio alcalino há perda da estrutura oligomérica da proteína devido à dissociação da macroproteína em subunidades menores. Com isso várias espécies coexistem em solução, tornando as amostras bastante complexas e o processo de análise mais difícil. O procedimento mais viável encontrado para o tratamento destes dados foi o uso de um modelo, no qual pudessem ser introduzidos vários parâmetros conhecidos que eram mantidos fixos, a fim de simplificar e melhorar os ajustes.

Na análise das curvas de  $c(s)$  a análise dos dados foi realizada como descrito acima, onde as propriedades do monômero,  $V_{\text{bar}}$  (0,733 g/mL) e intervalo de coeficiente de sedimentação na faixa de 1 a 3 S, foram fixados nos ajuste. Esta faixa de coeficiente de sedimentação foi escolhida de tal modo que, o  $s^*$  da espécie monomérica na mistura fosse o mesmo determinado anteriormente para as amostras de monômero puro. A razão friccional foi um parâmetro de regularização do processo.

---

Os ajustes das curvas de  $c(M)$  não foram possíveis para as amostras de proteína (oxi- e cianometá-HbGp) em pH 10, sendo realizados apenas para as amostras de monômero d. Isto se deve em parte ao fato de não existir nenhum modelo adequado no software, onde por exemplo, pudéssemos fixar as propriedades da espécie conhecida, monômero d, como foi realizado no tratamento das curvas de  $c(s)$ .

Esta dificuldade praticamente inviabilizou a determinação da massa molecular das subunidades presentes nas soluções de proteínas nestas condições, pois embora o coeficiente de sedimentação das espécies fosse conhecido, o coeficiente de difusão não era. Desta forma, não foi possível prever a massa das espécies pela razão  $s/D$ .

A partir dos dados experimentais obtêm-se o coeficiente de sedimentação experimental  $s^*$ . No entanto na análise deste parâmetro devemos converter através do software SEDNTERP o  $s^*$  em  $s_{20,w}$ , correspondente meio aquoso a 20 °C. Quando devidamente corrigido, o coeficiente de sedimentação é um parâmetro extremamente valioso para caracterizar mudanças no tamanho ou forma de uma macromolécula.

As contribuições do solvente para o  $s$  são facilmente contabilizadas, convertendo o  $s^*$  em  $s_{20,w}$  (coeficiente de sedimentação observado em água a 20 °C). Quando extrapolamos os valores de  $s_{20,w}$ , para uma condição, na qual não é observado efeito da concentração sobre este parâmetro, ou seja, para a concentração zero da macromolécula em estudo, obtêm-se o  $s_{20,w}^0$  que é uma propriedade intrínseca da dada macromolécula em estudo. Alterações na  $s_{20,w}^0$  por diferentes



---

condições experimentais tais como, temperatura, pH, a adição de ligantes. O valor de,  $s_{20}^0, w$  isolado não pode ser usado para determinar a forma de uma molécula.

Avanços na instrumentação, juntamente com os progressos nas análises de dados de velocidade de sedimentação, tornaram esta técnica uma ferramenta poderosa para detectar e caracterizar os efeitos sutis de pequenas moléculas ligadas à estrutura macromolecular. Trabalhos recentes sugerem que a análise de velocidade de sedimentação será uma poderosa ferramenta para a análise de misturas de macromoléculas.

#### **4.3. Determinação independente do $V_{bar}$ de proteínas por densitometria**

O volume específico,  $V_{bar}$ , é um parâmetro fundamental para a análise quantitativa de dados experimentais de ultracentrifugação analítica, AUC. Por esta razão, um experimento adicional foi realizado com o objetivo de obter um valor de  $V_{bar}$  independente dos experimentos de AUC. Amostras de oxi-HbGp em concentração variável de proteína na faixa de 0,5 a 4,0 mg/mL foram preparadas no mesmo solvente, utilizado nos experimentos de AUC, ou seja, 100 mM Tris - HCl e 50 mM, NaCl no pH 7,0. As densidades das soluções de proteína e do solvente foram medidas a  $20,0 \pm 0,1$  °C em um densitômetro (DMA - 4500, Anton Paar, Graz, Áustria), na Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

---

A precisão da medição foi de  $\pm 1 \times 10^{-4}$  g/mL. O  $V_{\text{bar}}$  pode ser calculado a partir da equação 09 [58,59], onde  $dp/dc$  é o incremento de densidade com a concentração, que pode ser obtido a partir da inclinação do gráfico da densidade versus concentração, e  $\rho_0$  é a densidade do solvente (g/mL).

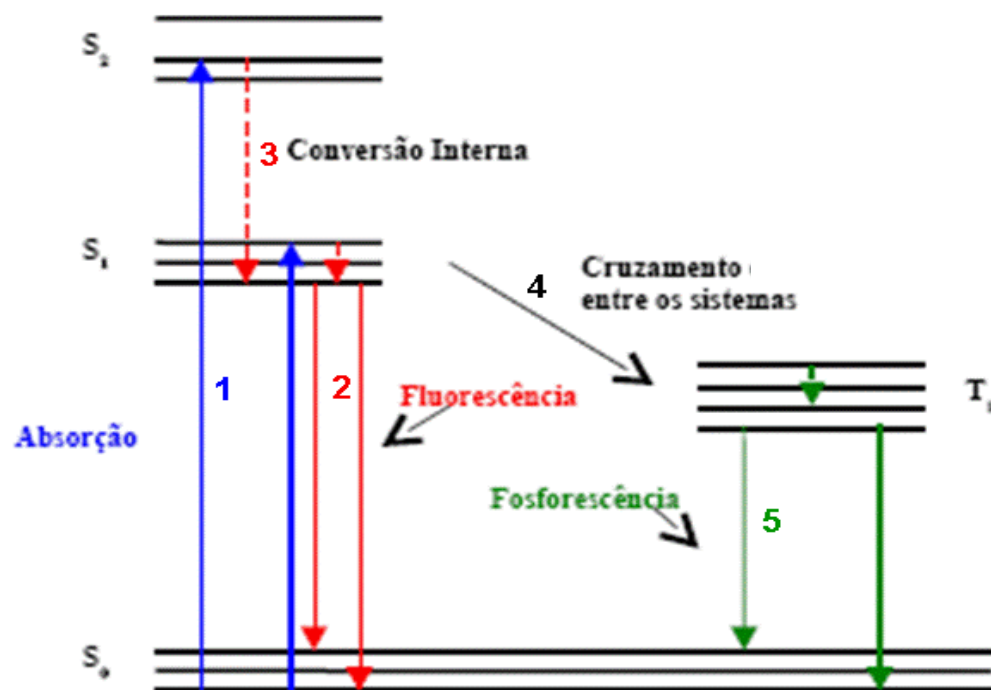
$$V_{\text{bar}} = \left( \frac{1 - dp/dc}{\rho_0} \right) \quad (\text{Equação 09})$$

#### 4.4. Fluorescência

A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência Figura 11. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto,  $T_n$ ) [ 60].

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica bastante útil no estudo de moléculas biológicas. As modificações na estrutura tridimensional de uma proteína, como processo de desnaturação, supressão e interação com pequenas moléculas e com o meio, podem ser avaliadas através desta técnica.

A emissão de fluorescência ocorre quando uma dada molécula é excitada, por meio da absorção de fótons, seguida por emissão de luz em comprimento de onda maior, ou seja, a energia emitida pelas moléculas na forma de fluorescência é menor que a energia envolvida no processo de absorção. Como o tempo de vida da molécula no estado excitado é relativamente longo  $10^{-9}$  s, parte da energia absorvida é transferida para o meio, ou suprimida por vários fenômenos a fluorescência, tais como: movimentos vibracionais, rotacionais, etc [60].



**Figura 11:** Diagrama de Jablonski. (1) Absorção de radiação ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), (2) Emissão de fluorescência ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), (3) Conversão interna e relaxação vibracional ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), (4) Cruzamento intersistemas ( $S_1 \rightarrow T_1$ ), (5) Emissão de fosforescência ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) [61].

---

Embora muitas moléculas interajam com a radiação eletromagnética, absorvendo luz, poucas moléculas na natureza, apresentam fluorescência. Quando a diferença de energia entre  $S_1$  (primeiro estado Singlete excitado) e  $S_0$  (estado fundamental) não for muito grande e existir possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada ao estado fundamental,  $S_0$ , por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética. No entanto, quando a diferença energética entre  $S_1$  e  $S_0$  for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental ocorrerá com emissão de radiação na forma de fluorescência [60,61].

Os processos de desativação radiativos ou não radiativos dependem não somente da sua probabilidade relacionada com o coeficiente de Einstein para emissão espontânea, controlada pelas regras de seleção, mas também das diferenças de energias entre os estados e da cinética dos processos, através dos valores relativos das constantes de velocidade[61].

Para que ocorra a fluorescência, uma molécula precisa ter a estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa  $S_1 \rightarrow S_0$ . Esses dois fatores são críticos na determinação da magnitude da eficiência quântica de fluorescência de uma substância. A eficiência quântica de fluorescência (ou rendimento quântico) de uma substância é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos. Uma molécula será significativamente fluorescente se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável entre 0,1 e 1 [61].

---

A espectroscopia de fluorescência é uma excelente técnica para monitorar processos de dissociação e desnaturação de proteínas. Em geral, a fluorescência das proteínas é do tipo, intrínseca, ou seja, é associada aos, aminoácidos aromáticos, que fazem parte de sua constituição e são responsáveis pela emissão de fluorescência.

Os três aminoácidos aromáticos presentes são responsáveis os pela fluorescência das proteínas: triptofano, tirosina e fenilalanina. O estudo da emissão de fluorescência do triptofano é o mais utilizado em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados com mudanças conformacionais locais de proteínas. Isto se deve em parte pelo fato do triptofano ser bastante sensível ao ambiente ao qual ele está exposto, apresentando diferentes características fluorescentes, que são dependentes do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína. Além disso, este aminoácido apresenta um bom rendimento quântico, quando comparado aos outros dois. Proteínas na presença de ligantes podem sofrer mudanças na região dos triptofanos que podem ser monitoradas pela técnica de fluorescência [61].

Segundo o modelo do monômero *d* da HbGp, proposto por Cabral e colaboradores [62], pelo menos um dos três triptofanos, que são os resíduos responsáveis pela fluorescência das cadeias globínicas, está praticamente mergulhado no bolsão do heme. As condições do meio que geram a solvatação dos triptofanos das cadeias polipeptídicas devem representar condições próximas daquelas que correspondem a uma acessibilidade mais efetiva do solvente aquoso em relação ao bolsão, a priori, hidrofóbico do heme. Assim, com as medidas de fluorescência pode-se acompanhar os processos de dissociação da HbGp em função do pH. As medidas de

---

fluorescência estática neste trabalho foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi F4500.

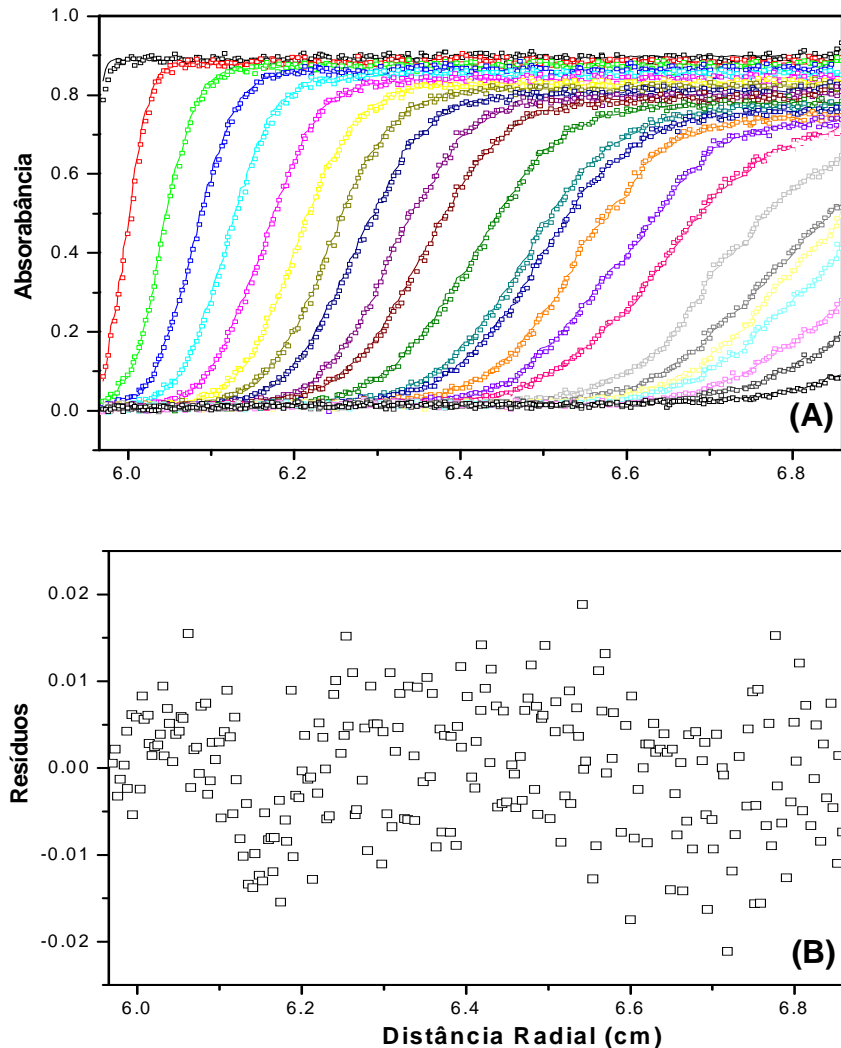
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Resultados de ultracentrifugação analítica (AUC)**

#### **5.1.1. Estudos em pH 7,0 das formas oxi e cianometa-HbGp**

A Figura 12 mostra os dados obtidos na ultracentrifugação analítica é apresentado, mostrando a absorbância versus a distância radial, raio, para oxi-HbGp 100 µg/mL. A figura mostra também um exemplo da análise dos dados de velocidade de sedimentação para HbGp a 20 °C pelo software SEDFIT, onde o perfil dos resíduos, obtido do ajuste é mostrado na parte inferior.

A partir da figura e da distribuição de resíduos pode-se inferir que o método utilizado no ajuste dos dados é muito bom, pois há uma sobreposição das curvas experimentais e ajustadas pelo software SEDFIT, além de que uma boa distribuição residual é observada.



**Figura 12:** Dados parciais de velocidade de sedimentação mostrando o ajuste utilizando o SEDFIT. (A) Curvas da Absorbância em 232 nm versus o raio da célula, para oxi-HbGp 100  $\mu\text{g/mL}$  em tampão Tris-HCl 100 mmol/L, 50 mmol/L de NaCl, pH 7,0. O experimento foi realizado a 20  $^{\circ}\text{C}$  e 8.000 rpm (rotor NA-60 Ti ). As linhas representam o ajuste feito no programa SEDFIT e os quadrados representam o dado experimental. (B) Resíduos fornecidos pelo software SEDFIT mostrando a qualidade do ajuste.

As Figuras 13 e 14 mostram as distribuições,  $c$  (s), dos coeficientes de sedimentação para três concentrações de hemoglobina e para os dois estados de oxidação do heme foram estudados. Elas apresentam um único pico, indicando uma

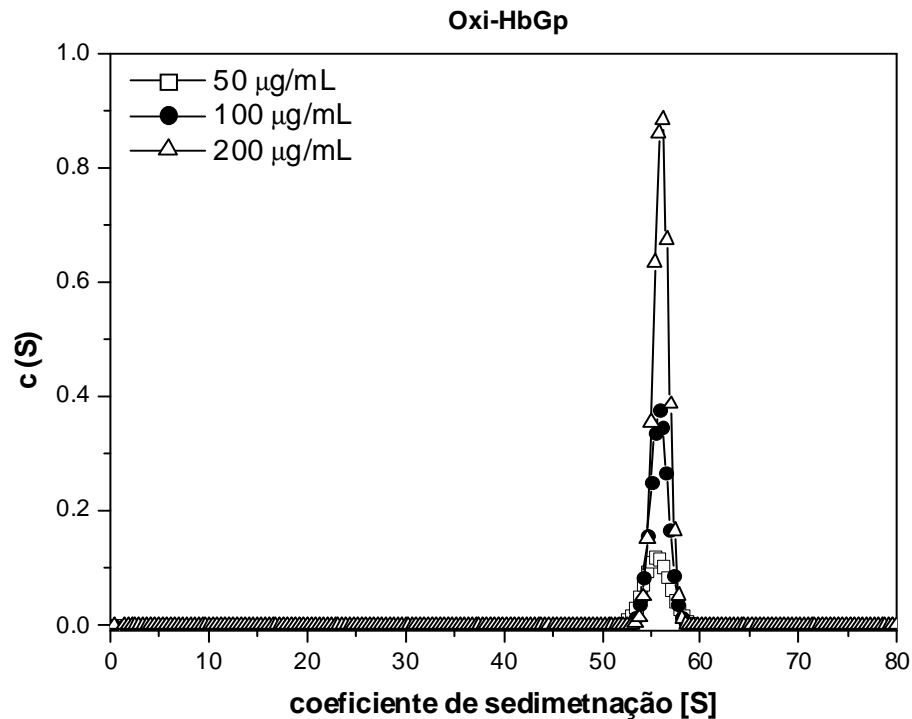


---

alta homogeneidade do sistema. É importante salientar que a distribuição  $c(s)$  obtida exclusivamente pelo SEDFIT não é um bom indicador da homogeneidade do sistema. Estes ajustes foram realizados a partir da fixação do  $V_{\text{bar}}$  0,755 mL/g determinado pelo software SEDFIT, onde a razão  $f/f_0$  foi o parâmetro de regularização dos ajustes.

Este valor de  $V_{\text{bar}}$  é consistente com os dados da literatura da hemoglobina de *L. terrestris*: 0,738 mL/g [63] e 0,740 mL/g [64]. Na determinação anterior da massa molecular da HbGp, um valor teórico de 0,729 mL/g foi utilizado sem uma explicação detalhada desta escolha [11].

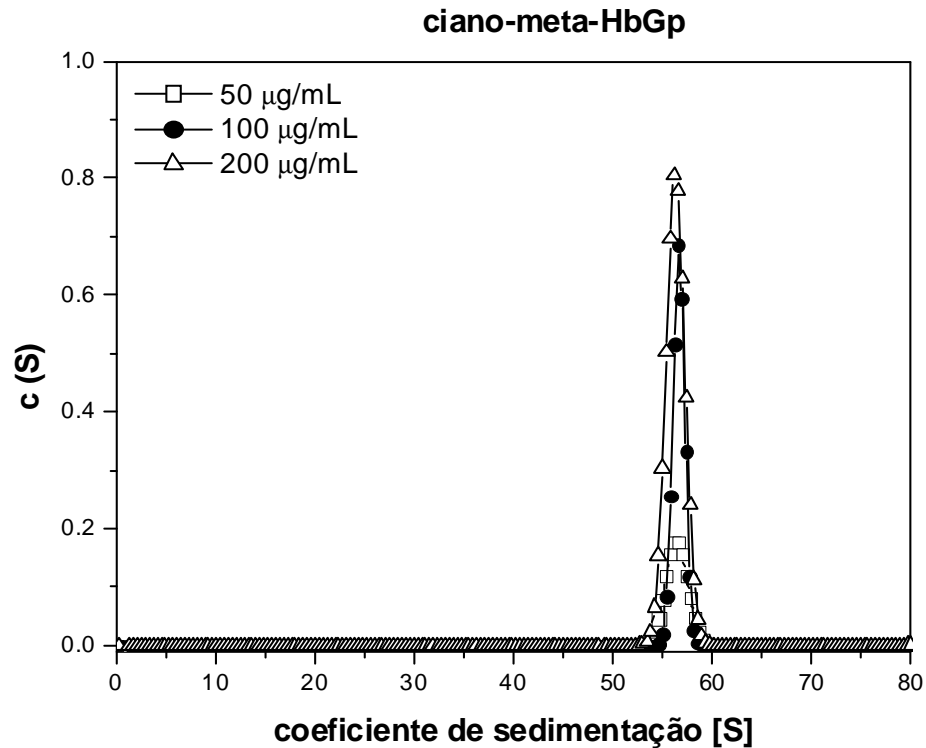
Contudo, nas distribuições foi observado um único pico para a grande maioria das amostras analisadas, onde 14 das 18 curvas analisadas apresentaram contribuição de uma única espécie, tanto através da distribuição pela  $c(s)$  quanto para os ajustes baseados no modelo de uma única espécie discreta. Visto que foi trabalhada com três concentrações de proteína e em dois comprimentos de onda, e o experimento foi realizado em duplicada, então para cada forma, oxi- e cianomet-HbGp foram obtidos 18 conjuntos de dados. Além disso, essa homogeneidade é coerente com a alta estabilidade da proteína em pH 7,0, como observado em espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e dos resultados de DLS [22,64,65]. Variando a concentração de proteína no intervalo de 0,1 a 5 mg/mL nos estudos de DLS a dimensão da proteína (diâmetro hidrodinâmico) manteve-se inalterada, sugerindo um oligômero estável em pH 7,0 nessa faixa de concentração.



**Figura 13:** Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da oxi-HbGp, para três concentrações distintas 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  em 100 mmol/L Tris-HCl pH 7,0, 50 mmol/L NaCl. O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o valor máximo dos picos das curvas de  $c(s)$ .

Os valores de  $s^*$  obtidos nos ajustes das curvas da  $c(s)$  foram corrigidos para condições padrão (água e 20 °C), e por regressão linear foi realizada a extrapolação, para condições de concentração infinitamente diluída, ou seja, próximo de 0 mg/mL de proteína, a fim de determinar os valores de  $s_{20,w}^0$ . Os valores de  $s_{20,w}^0$  para a oxi-HbGp e cianometa-HbGp no menor tempo de estocagem foram de  $58,0 \pm 0,6$  e  $59,8 \pm 0,1$  S, respectivamente. Para os outros tempos de estocagem os valores de  $s_{20,w}^0$  não foram muito diferentes destes valores, indicando alta estabilidade à auto-oxidação com o tempo de estocagem.

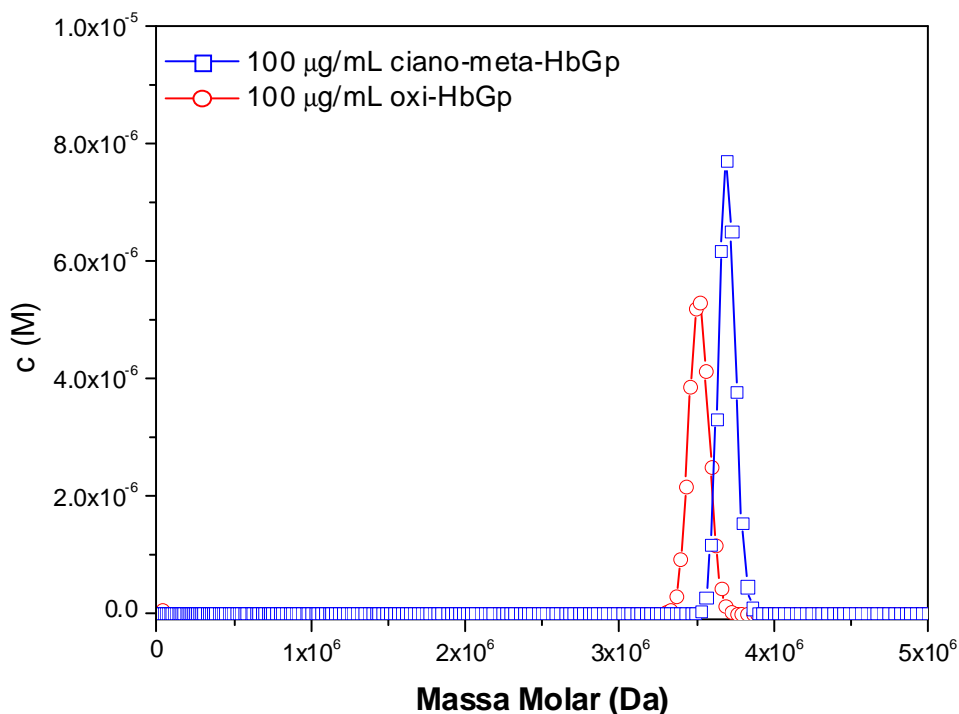
O erro mostrado nos resultados corresponde, à uma média de 18 pontos dos dados experimentais para ambas as formas estudadas, ou seja, oxi- e cianometa-HbGp. O valor de  $s$  foi obtido a partir do programa SEDFIT usando o valor mencionado acima do  $V_{bar}$  e os valores de viscosidade e densidade estimados pelo programa SEDNTERP.



**Figura 14:** Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da cianometa-HbGp, para três concentrações distintas 50, 100 e 200 µg/mL em 100 mmol/L Tris-HCl pH 7,0, 50 mmol/L NaCl. O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o valor máximo dos picos das curvas de  $c$  (s).

---

Na Figura 15, as distribuições da  $c$  (M) são mostradas para as duas formas de HbGp em uma única concentração de proteína de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Pode-se observar que a MM da cianometa-HbGp é um pouco mais elevada do que a da oxi-HbGp. Os parâmetros obtidos em nossos experimentos são mostrados na Tabela 1. Estes parâmetros foram obtidos a partir do ajuste pelo programa SEDFIT dos dados experimentais [66], para as distribuições da  $c$  (s) e  $c$  (M) e para os dois estados de oxidação da HbGp, ou seja, para cianometa- e oxi-HbGp em função do tempo de armazenamento da proteína. Os dados da razão friccional reportados na (Tabela 1) sugerem que a cianometa-HbGp e a oxi-HbGp, apresentam formas similares, onde este parâmetro permanece praticamente constante em função do tempo de estocagem. Esta observação está de acordo com trabalhos anteriores sobre a auto-oxidação da HbGp [27,28].



**Figura 15:** Distribuição contínua de massa molecular da HbGp nas formas oxi e cianometa. A figura mostra as curvas de  $c$  (M) para HbGp na concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$  em  $100 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl pH 7,0,  $50 \text{ mmol/L}$  NaCl. A massa molecular para cada forma foi determinada como o valor máximo dos picos das curvas da  $c$  (M).

Na Tabela 1 os valores de  $s_{20,w}^0$  foram obtidos por regressão linear como mostra a (Figura 16) utilizando todos os valores da  $s_{20,w}$ , obtidos em diferentes tempos de armazenamento para oxi- e cianometa-HbGp sendo de  $58,1 \pm 0,2$  e  $59,6 \pm 0,2$  S, respectivamente. A partir dos valores de  $s_{20,w}^0$  foi calculada a massa molecular para as duas formas de proteína pela razão  $s/D$ , Equação 07, onde para oxi- e cianometa-HbGp obteve-se  $3600 \pm 100$  e  $3700 \pm 100$  kDa, respectivamente Tabela 2.

**Tabela 1:** Resumo das análises de AUC da HbGp nas formas oxi e cianometa em 236 nm e  $20,0 \pm 0,1$  °C.

HbGp	Tempo de estocagem (meses)	$S_{20,W}^o$ (S)	M pela razão s/D (kDa)*	M pela c(M) (kDa)**	f/f <sub>0</sub>
oxi	0	$58,0 \pm 0,6$	$3620 \pm 120$	$3500 \pm 100$	$1,41 \pm 0,05$
	6	$58,5 \pm 0,1$	$3650 \pm 120$	$3600 \pm 100$	$1,36 \pm 0,04$
	12	$58,0 \pm 0,2$	$3620 \pm 130$	$3500 \pm 100$	$1,29 \pm 0,03$
cianometa	0	$59,8 \pm 0,1$	$3730 \pm 130$	$3600 \pm 100$	$1,30 \pm 0,05$
	6	$59,9 \pm 0,1$	$3740 \pm 130$	$3600 \pm 100$	$1,31 \pm 0,05$
	12	$59,3 \pm 0,1$	$3690 \pm 160$	$3700 \pm 100$	$1,33 \pm 0,05$

\* M calculada a partir da equação (07) com os seguintes valores:  $D_{20,W}^0 = 1,62 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg e  $1,64 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg para as formas oxi e cianometa-meta, respectivamente (ver na Tabela 2);  $V_{bar} = 0,755$  mL/g;  $\rho = 1,00316$  g / mL.

\*\* O valor representa uma média dos máximos dos picos oriundos de ajustes de distribuições c (M) como mostra a Figura 15.

Os valores de massa obtidos pela distribuição da c (M) e mostrados na Tabela 2 correspondem aos valores médios para os dados apresentados na Tabela 1. Para comparação, os valores esperados de massa obtidos a partir da análise através de MALDI-TOF-MS [16] foram incluídos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Dados hidrodinâmicos experimentais e preditos para oxi e cianometa-HbGp.

		oxi	cianometa
$M$ (kDa)	3560 <sup>a</sup>	-	-
$s_{20,w}^0$ (S)	75,2 <sup>b</sup>	$58,1 \pm 0,2^c$	$59,6 \pm 0,2^c$
$D_{20,w}^0$ ( $10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /seg)	2,1 <sup>b</sup>	$1,62 \pm 0,01^d$	$1,64 \pm 0,01^d$
$M$ pela $c(M)$ (kDa) <sup>e</sup>	-	$3500 \pm 100$	$3600 \pm 100$
$M$ pela razão $s/D$ (kDa) <sup>f</sup>	-	$3630 \pm 120$	$3720 \pm 140$
$f/f_0$	1,0 <sup>b</sup>	$1,35 \pm 0,06^e$	$1,31 \pm 0,05^e$
		$1,30 \pm 0,01^g$	$1,27 \pm 0,01^g$
$R_s$ (Å)	102 <sup>b</sup>	$135 \pm 1^d$	$134 \pm 1^d$
		$132 \pm 1^g$	$129 \pm 1^g$

<sup>a</sup> Estimativa baseada na estequiometria  $12(abcd)_3L_3$ , considerando a  $M$  das subunidades determinada por espectrometria de massas [16], e considerando também a presença de 144 grupos heme.

<sup>b</sup> extrapolação de dados pelo software Sednterp assumindo que a HbGp é uma proteína esférica e globular de massa 3560 kDa.

<sup>c</sup> Dados obtidos a partir da regressão linear mostrada na figura 16 (ver texto para detalhes).

<sup>d</sup> Dados de experimentos de espalhamento dinâmico de luz.

<sup>e</sup> Dados calculados pelo software SEDFIT e apresentados como uma média dos valores apresentados na Tabela 1 (Média dos três tempos de estocagem).

<sup>f</sup>  $M$  calculada pela Equação 7 usando  $s_{20,w}^0$  determinada a partir da figura 12 e  $D_{20,w}^0$  determinada a partir de experimentos de espalhamento dinâmico de luz.

<sup>g</sup>  $R_s$  e  $f/f_0$  Esperados para uma partícula que apresenta  $s_{20,w}^0$  experimental, calculado pelo software Sednterp.

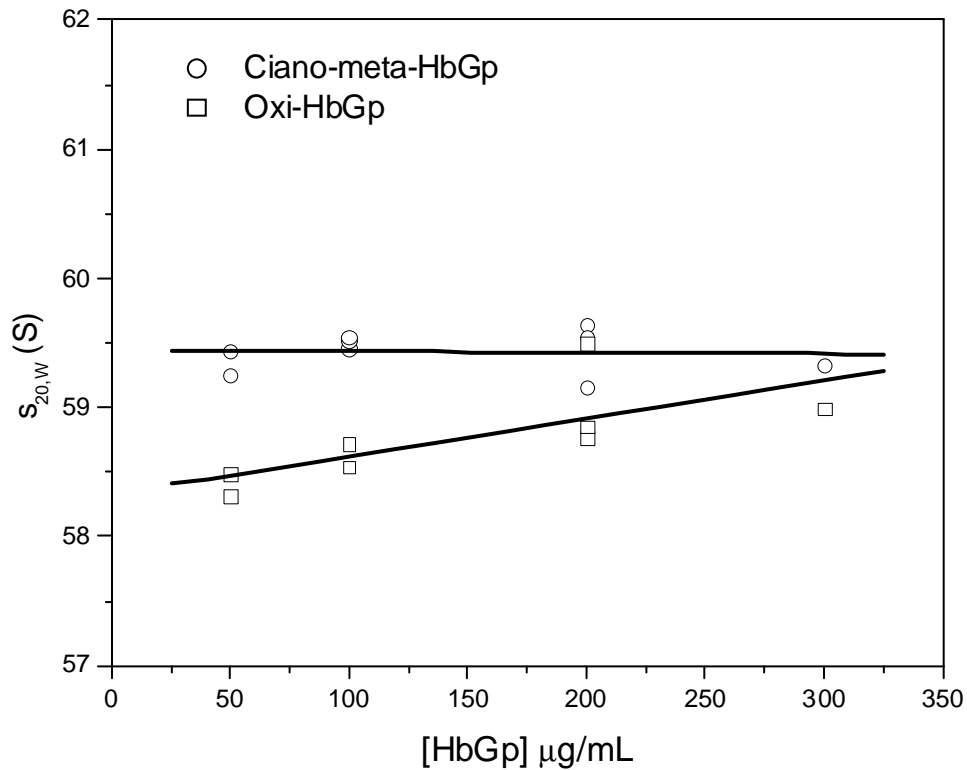
É importante salientar que os valores de massas determinados tanto pela  $c(M)$ , quanto pela razão  $s/D$  são muito próximos estando dentro do erro experimental, sendo

---

que ambos estão de acordo com os valores de massas esperados da análise por MALDI-TOF-MS. Com estes resultados infere-se que a estequiometria  $12(abcd)_3L_3$  proposto por Vinogradov e colaboradores para a HbLt é a mesma para a HbGp [ 64 ].

A Figura 16 mostra que a oxi-HbGp apresentou comportamento dependente da concentração, e que a cianometa-HbGp não apresenta o mesmo comportamento, o que está de acordo com a maior estabilidade da cianometa nestas condições [27,28]. Normalmente, um declive negativo na curva do  $s_{20,w}$  versus concentração protéica é devido à assimetria ou a efeitos da viscosidade [67], e uma inclinação positiva, tal como observado para oxi-HbGp, deve estar associado à agregação [67]. No entanto, o declive positivo observado para oxi-HbGp foi 70 vezes menor em comparação aos resultados caracterizados anteriormente e que caracterizam a agregação protéica no sistema [68]. Assim, acreditamos que a inclinação positiva observada para a oxi-HbGp é um artefato devido a sua menor estabilidade em comparação com a cianometa-HbGp. Além disso, existem dados que sugerem que a oxi-HbGp não agrega em função do aumento da concentração (como mencionado mais adiante).





**Figura 16:**  $s_{20,W}$  versus a concentração de HbGp. A figura mostra  $s_{20,W}$  versus concentração de HbGp em todos os tempos de armazenamento ajustado com uma linha reta, a fim de calcular o  $s_{20,W}^0$ . Para oxi-HbGp foi observado um  $s_{20,W}^0$  de  $58,1 \pm 0,2$  e  $59,6 \pm 0,2$  para cianometeta-HbGp (Tabela 2).

A Tabela 2 (segunda coluna) mostra os dados hidrodinâmicos esperados para uma proteína globular de 3600 kDa e calculados pelo software SEDNTERP através das equações de Stokes e Svedberg são mostrados [40]. Comparando os dados experimentais e os esperados, pode-se concluir que a HbGp é uma proteína assimétrica com um  $f/f_0$  de aproximadamente 1,33. O experimento de DLS para oxi-HbGp determinou um  $R_s$ , o raio de uma proteína hidratada, de  $135 \pm 1 \text{ \AA}$ . Este valor está de acordo com o raio de giro obtido para HbGp através de SAXS e mostram uma

---

boa concordância com o modelo da HbGp como um proteína dodecamérica, semelhante ao proposto por Vinogradov e colaboradores para a HbLt [68].

O valor de massa obtido para HbGp de  $3,6 \pm 0,1$  MDa é significativamente superior ao valor de 3,1 MDa relatado anteriormente [11]. A melhoria dos métodos de ultracentrifugação e, especialmente, a disponibilidade de programas que permitem uma análise multiparamétrica de dados experimentais, contribuiu certamente para obter um resultado mais coerente com o valor de massa esperado para esta proteína.

O valor de M 3,6 de MDa obtido é mais coerente tanto com a descrição de massas semelhantes para hemoglobinas extracelulares, como com a massa esperada a partir do modelo de Vinogradov e colaboradores para a HbLt [68]. É notável que, mesmo para HbLt, que é muito estudada por muitos pesquisadores, ainda restam algumas discussões na literatura relacionada ao valor real da massa desta proteína. Uma discussão detalhada sobre esta questão foi feita por Daniel e colaboradores [69], onde dados de Vinogradov e colaboradores [68] e Riggs e colaboradores [70,71] são comparados, sugerindo um terceiro modelo, que inclui um tetrâmero adicional (abcd) por 1 / 12 da molécula inteira.

Uma discussão detalhada da composição das cadeias polipeptídicas da HbGp é ainda uma questão não completamente resolvida. Com a caracterização parcial da massa molecular de polipeptídeos da HbGp por MALDI-TOF-MS [16], e considerando a hipótese do modelo de Vinogradov para a estrutura oligomérica da HbLt ser idêntica à da HbGp,  $12[(abcd)]_3L_3$ , obtemos um valor de massa similar ao determinado neste

---

trabalho. Também é interessante que um valor de MM de 3.6 MDa corresponde praticamente ao previsto para a massa de HbLt baseada no modelo de Vinogradov de  $12[(abcd)_3L_3]$ , [64], para a HbLt bem como ao valor estimado a partir da estrutura cristalográfica [14].

Zhu e colaboradores [18] propuseram que a dissociação devido a oxidação pode ser responsável pela redução da massa aparente observada experimentalmente. Alguns valores baixos relatados no início das determinações das massas moleculares poderiam provavelmente ser atribuídos à falta de procedimentos adequados para a extração da hemoglobina que evitasse a oxidação. Nossa determinação atual para massa da HbGp demonstrou que, independente do estado de oxidação, tanto a oxi, quanto a cianometá-HbGp que é muito estável, apresentam os mesmos valores de massa dentro do erro experimental. Este resultado provavelmente corresponde à ausência de um polipeptídeo adicional no interior do HBL (Hemoglobina com bicamada hexagonal), como sugerido por Daniel e colaboradores [69] para a HbLt.

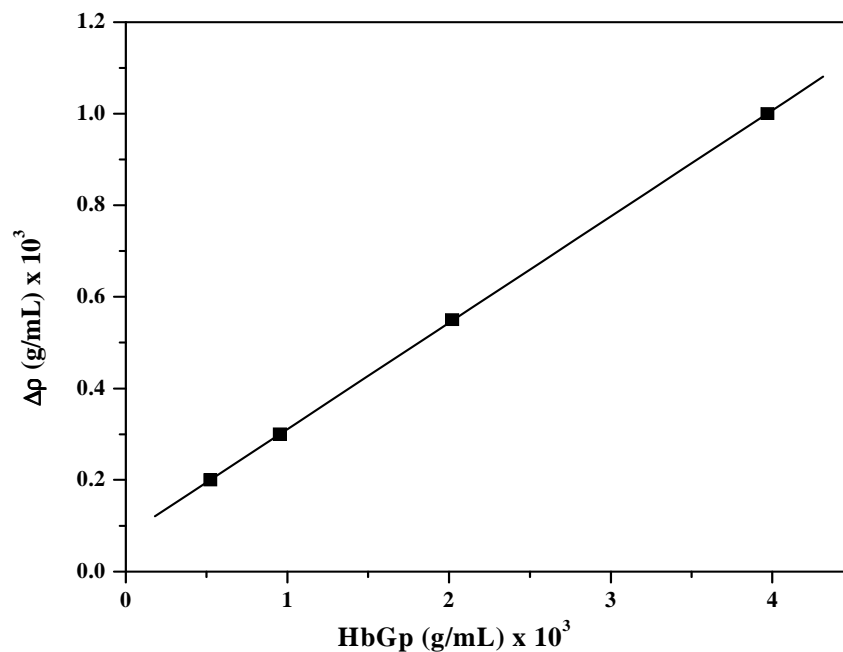
Estes resultados baseado nos dados de AUC, com uma determinação independente do  $V_{bar}$  para todo o oligômero integra, juntamente com trabalhos da literatura, e com base em outras técnicas experimentais, sugerem fortemente que a HbGp é uma proteína homogênea e bastante estável em pH 7,0. O valor do  $V_{bar}$  determinado por desitometria de 0,764 mL/g para a estrutura oligomérica também é mais razoável do que o valor de 0,729 mL/g utilizado anteriormente para a estimativa de massa da HbGp [11]. De fato, com base na seqüência de aminoácidos da cadeia monomérica d, que é a única no momento disponível [39], um valor teórico de 0,733 foi

---

obtido através do programa SEDNTERP. Espera-se que o oligômero íntegro deveria ser menos denso em comparação aos monômeros isolados [58], em consonância com um valor mais elevado, como observado em nossos resultados experimentais.

### 5.1.2. Determinação Independente do $V_{\text{bar}}$

O  $V_{\text{bar}}$  é um parâmetro importante nas análises de dados de ultracentrifugação analítica. No intuito de obter uma melhor qualidade e representatividade dos dados foi feita uma estimativa independente deste parâmetro. Soluções de HbGp em diferentes concentrações no intervalo de 0,5 a 4,0 mg/mL, e no mesmo tampão utilizado nos experimentos de ultracentrifugação, foram utilizadas. Cada valor de densidade corresponde à média de duas medidas independentes. O cálculo do  $V_{\text{bar}}$  foi realizado utilizando a equação 5, e o resultado é mostrado na Figura 17. O valor obtido neste experimento foi de  $0,764 \pm 0,008$  g/mL, está em excelente concordância com os valores obtidos a partir da otimização realizada pelo software SEDFIT.



**Figura 17:** Variação da densidade em função da concentração de proteína para oxi-HbGp em Tris-HCl 100 mmol/L, 50 mmol/L NaCl, pH 7,0. O valor da  $V_{\text{bar}}$  foi calculado a partir da equação (5) com a inclinação da reta.

### 5.1.3. Monômero puro nos pHs 7,0 e 10,0

Os experimentos para o monômero *d* puro foram realizados em 100 mmol/L Tris-HCl contendo 50 mmol/L NaCl, nos pH 7,0 e 10,0 a 20 °C. As concentrações de proteínas utilizadas foram de 40, 80 e 130  $\mu\text{g/mL}$  e a velocidade do rotor foi de 8.000 rpm. Estas concentrações foram menores que as das amostras para a proteína íntegra devido à dificuldade de obter esta subunidade em concentrações maiores.

Um procedimento semelhante ao realizado para a proteína íntegra no pH 7,0 foi utilizado na análise dos dados do monômero *d* puro, sendo o  $V_{\text{bar}}$  o primeiro parâmetro

---

a ser determinado nos ajustes. Este parâmetro foi calculado a partir da seqüência de aminoácidos e por meio de ajustes experimentais através do software SEDFIT. A partir deste software foi calculado um valor de  $V_{\text{bar}}$  de  $0,736 \pm 0,004$  mL/g, (onde o erro deste valor corresponde à média de 6 um conjunto de medidas de dados experimentais para ambos os valores de pH 7,0 e 10,0). Este parâmetro também foi determinado utilizando a seqüência primária desta subunidade [71] pelo programa SEDNTERP, onde foi obtido um valor de  $V_{\text{bar}}$  de  $0,733$  mL/g. O parâmetro  $V_{\text{bar}}$  fornecido por este programa representa uma boa aproximação, pois uma comparação com o valor experimental obtido para a proteína íntegra e com o valor obtido por meio da seqüência primária mostra que o valor fornecido pelo programa é bastante satisfatório.

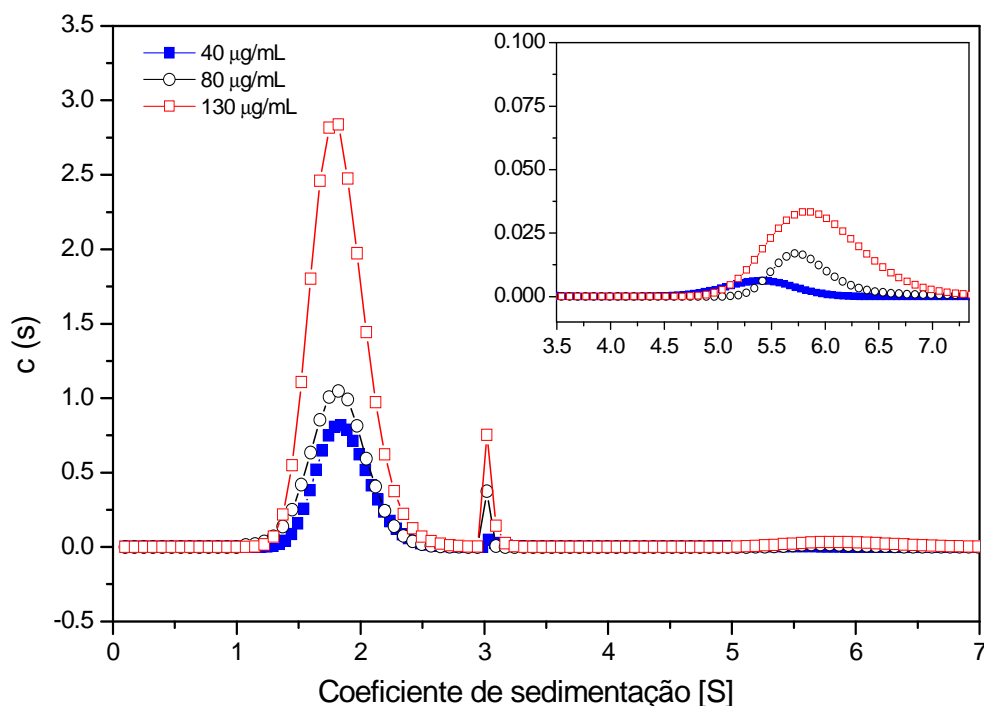
Este resultado não é muito diferente do valor obtido para a HbGp íntegra de  $0,755 \pm 0,004$  mL/g [72] determinado pelo SEDFIT, e também está de acordo com os dados da literatura relativos à hemoglobina de *L. terrestris*:  $0,738$  mL/g [64] e  $0,740$  mL/g [68]. Ambos os valores estão em excelente concordância.

O valor de  $s^*$  foi obtido a partir do programa SEDFIT, usando o valor de  $V_{\text{bar}}$  descrito acima, e os valores de viscosidade e densidade estimados pelo programa SEDNTERP, já mencionado na seção de materiais e métodos.

O cálculo do valor do coeficiente de sedimentação  $s$  é importante para caracterizar mudanças no tamanho e na forma das macromoléculas causadas por mudanças nas condições externas. Entretanto, o valor calculado de  $s$  deve ser sempre extrapolado para as condições padrões que são aquelas correspondentes ao solvente

---

aquoso e a 20 ° C, resultando no  $s_{20,w}$ , afim de eliminar as interferências da viscosidade,  $\eta$ , e da densidade,  $\rho$ . Esta extrapolação elimina as contribuições do solvente e pode ser calculada com o uso do programa SEDNTERP quando este está configurado com as concentrações do solvente usado experimentalmente. O cálculo do valor de  $s_{20,w}$  permite ainda a comparação de dados obtidos em diferentes condições experimentais. O valor de  $s_{20,w}$  pode ser obtido para várias concentrações de proteína em análise, e a extrapolação da curva para concentração zero permite a obtenção de  $s_{20,w}^o$  que é uma propriedade única, característica, da macromolécula. Mudanças no valor de  $s_{20,w}^o$  causadas por mudanças nas condições experimentais (temperatura, pH, adição de ligantes, etc) podem ser resultantes apenas de variações na massa e não da forma da macromolécula [42].



**Figura 18:** Distribuição do coeficiente de sedimentação para o monômero  $d$  em 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7,0), 50 mmol/L NaCl, monitorado em 236 nm. A figura exibe as curvas de  $c$  (s) para as concentrações de monômero de 40, 80 e 130  $\mu\text{g/mL}$ . A inserção mostra os detalhes na distribuição para o intervalo de  $s$  de 3,5 a 7,5. O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o máximo das curvas Gaussianas.

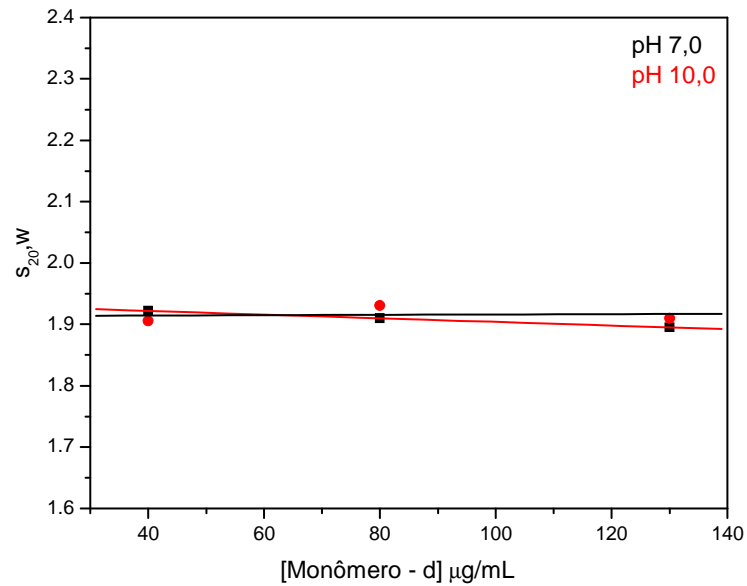
A Figura 18 mostra as distribuições  $c$  (s) com os respectivos coeficientes de sedimentação para três concentrações de monômero  $d$  no pH 7,0. Elas exibem um pico principal intenso, indicando uma alta homogeneidade do sistema. É importante enfatizar que os dados de MALDI-TOF-MS [16] também sugerem um elevado grau de pureza da fração monomérica, apresentando várias isoformas de massas em torno de 16,6 kDa.

O valores de  $s$  foram corrigidos para as condições padrão (água e 20 °C), e, extrapolados por regressão linear, a fim de se obter os valores do  $s_{20,w}^0$ , que



---

correspondem a 0 mg/mL de proteína. Os valores de  $s_{20,w}^0$ , para o monômero  $d$  foram  $1,90 \pm 0,01$  S e  $1,95 \pm 0,01$  S, nos pH 7,0 e 10,0, respectivamente. Como pode ser observado a partir da Figura 18 e da Tabela 3 duas espécies adicionais são observadas nas distribuições  $c(s)$ : correspondente a um pico em  $3,20 \pm 0,03$  e outro em torno 5,5 - 5,9 S. O pico em 3,21 S corresponde ao dímero de monômeros  $d_2$ . Sua presença foi também detectada anteriormente em experimentos de espectrometria de massa [16]. O pico em 5,5 - 5,9 S pode estar provavelmente, associado à tetrâmeros de monômeros  $d_4$ , ou a agregados. Ambos, dímeros e tetrâmeros de monômeros contribuem juntos em torno de 5% do total na distribuição. Esta estimativa, mostrada na Tabela 4, está baseada nas áreas dos picos das distribuições. Assim, os dados de AUC sugerem que a fração monomérica obtida por filtração em gel é realmente bastante pura, contribuindo com mais de 93 - 95% da área total das distribuições,  $c(s)$ , como mostra a Figura 18. Estes dados também são coerentes com as observações anteriores de MALDI-TOF-MS [16].



**Figura 19:**  $s_{20,w}$  versus a concentração do monômero  $d$  nos valores de pH 7,0 e 10,0.

Também é digno de nota enfatizar o comportamento independente do coeficiente de sedimentação  $s_{20,w}^0$  do monômero  $d$  com a concentração, Figura 19. Tal comportamento foi observado para a forma cianometa-HbGp no pH 7,0, e pode estar relacionado com a estabilidade e forma bastante simétrica (globular) desta subunidade, Figura 19. O mesmo comportamento é observado para o monômero  $d$  no pH 10,0.

**Tabela 3:** Coeficientes de sedimentação para o monômero *d* puro e para as espécies dissociadas das formas cianometa e oxi no pH alcalino.

Amostras	pH	Espécies Observadas				
		$S_{20,W}^0$				
		1	2	3	4	5
Monômero	7,0	1,95 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	-	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	-
	10,0	1,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	-	5,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	-
Oxi-HbGp	10,0	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	-
	10,0	1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	-
Oxi-HbGp <sup>1</sup>	10,0	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	5,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	-
	10,0	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	5,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	-
Cianometa-HbGp	10,0	1,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	58,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
	10,0	1,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	57 ± 2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Absorbância monitorada em 236 nm

<sup>b</sup> Absorbância monitorada em 416 nm

Oxi-HbGp<sup>1</sup> – Amostra de oxi-HbGp exposta a β-mercaptoethanol;

Espécies 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem ao monômero *d*, dímeros de monômero *d*<sub>2</sub> e linkers, trímero (*abc*), tetrâmero (*d*<sub>4</sub> ou *abcd*), e cianometa-HbGp íntegra, respectivamente.

**Tabela 4:** Contribuição percentual de todas as espécies observadas em equilíbrio nas amostras descritas na Tabela 03.

Amostras	pH	Espécies Observadas				
		% (Área)				
		1	2	3	4	5
Monômero	7,0	95 ± 4 <sup>a</sup>	2,5 ± 2 <sup>a</sup>	-	2,5 ± 2 <sup>a</sup>	-
	10,0	93 ± 3 <sup>a</sup>	5 ± 3 <sup>a</sup>	-	2 ± 1 <sup>a</sup>	-
Oxi-HbGp	10,0	39 ± 3 <sup>a</sup>	34 ± 8 <sup>a</sup>	22 ± 4 <sup>a</sup>	5 ± 4 <sup>a</sup>	-
	10,0	42 ± 3 <sup>b</sup>	29 ± 4 <sup>b</sup>	23 ± 2 <sup>b</sup>	6 ± 2 <sup>b</sup>	-
Oxi-HbGp <sup>1</sup>	10,0	66 ± 6 <sup>a</sup>	26 ± 8 <sup>a</sup>	-	8 ± 4 <sup>a</sup>	-
	10,0	45 ± 6 <sup>b</sup>	39 ± 4 <sup>b</sup>	-	16 ± 1 <sup>b</sup>	-
Cianometa-HbGp	10,0	24 ± 3 <sup>a</sup>	26 ± 5 <sup>a</sup>	29 ± 8 <sup>a</sup>	3 ± 2 <sup>a</sup>	18 ± 2 <sup>a</sup>
	10,0	26 ± 2 <sup>b</sup>	29 ± 2 <sup>b</sup>	22 ± 3 <sup>b</sup>	3 ± 2 <sup>b</sup>	19 ± 5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Absorbância monitorada em 236 nm

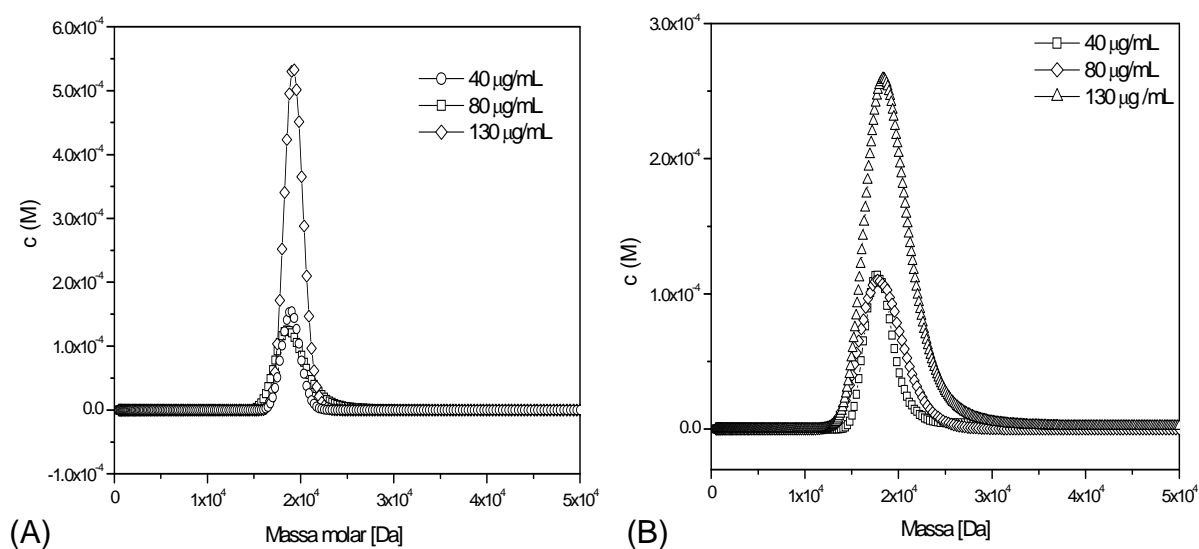
<sup>b</sup> Absorbância monitorada em 416 nm

Oxi-HbGp<sup>1</sup> – Amostra de oxi-HbGp exposta a β-mercaptoethanol;

Espécies 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem ao monômero **d**, dímeros de monômero **d<sub>2</sub>** e linkers, trímero (**abc**), tetrâmero (**d<sub>4</sub>** ou **abcd**), e cianometa-HbGp íntegra, respectivamente.

As Figuras. 20A e 20B mostram as distribuições pela *c* (M), para três concentrações do monômero *d* nos valores de pH 7,0 e 10,0, respectivamente. As massas foram determinadas como uma média do máximo dos picos nas curvas da *c* (M). As massas molares determinadas para os dois valores de pH foram de 19 ± 1,0 kDa e 17,3 ± 0,4 kDa, no pH 7,0 e 10,0, respectivamente. Estas MM para o monômero

*d* são maiores que aqueles obtidos nas análises MALDI-TOF-MS, onde foi obtido uma massa de 16,6 kDa para a isoforma principal. No entanto, estes valores de massa mais elevados podem estar associados à presença de outras espécies, dímeros de monômeros, que apresentam massas mais elevadas, e de baixa contribuição, sendo apenas 5 – 7 % do total da amostra, Tabela 4. Portanto, como estas espécies não são observadas na distribuição das curvas da  $c(M)$ , é bastante provável que esta esteja contribuindo para um deslocamento do máximo dos picos para valores mais elevados.



**Figura 20:** Distribuição da massa molecular  $c(M)$  para o monômero *d*. (A) pH 10,0 e (B) pH 7,0. A figura mostra as curvas de  $c(M)$  para as concentrações de monômero *d* 40, 80 e 130  $\mu\text{g/mL}$  em tampão Tris-HCl 100 mmol/L, 50 mmol/L NaCl. A massa molecular foi determinada como o valor máximo dos picos nas curvas da  $c(M)$ .

---

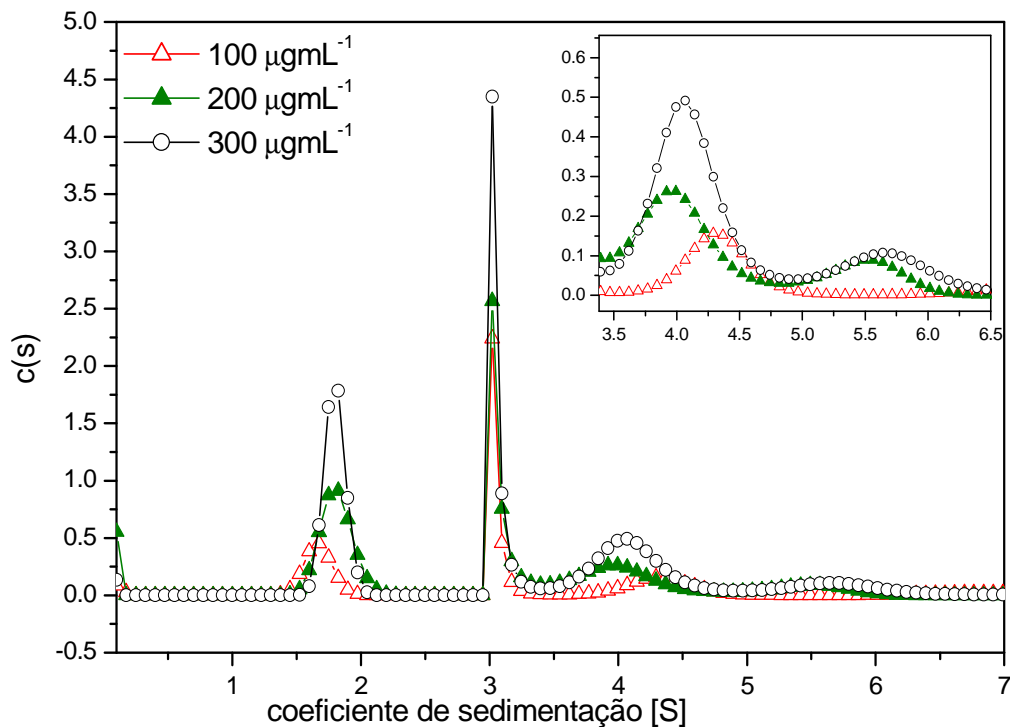
#### 5.1.4. Oxi-HbGp em pH 10,0, na ausência e presença de $\beta$ -mercaptoethanol

Na Figura 21 são mostradas as distribuições de  $c(s)$  para oxi-HbGp em pH 10,0 para três concentrações de proteína distintas, 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . Pode-se observar que várias espécies diferentes aparecem na distribuição: um primeiro pico em 1,90 S corresponde ao monômero, um segundo pico em, 3,21 S correspondente aos dímeros de monômeros, que é comum ao que ocorre na fração do monômero  $d$  puro (Figura 18), mas aparecem com diferentes intensidades relativas.

Esta maior intensidade do segundo pico 3,21 S pode estar associada ao fato que, os linkers tem massa molecular média de 28 kDa, podendo estar aparecendo na mesma posição que os dímeros de monômero, que apresentam massa em torno de 32 – 33 kDa. Como as massas das duas espécies são próximas, estas se tornam praticamente indistinguíveis. Além disso, um pico em 4,1 - 4,5 S e outro em 5,1 – 6,9 S aparecem na distribuição de  $c(s)$ , Tabela 3. O pico de 4,4 S é atribuído ao trímero,  $abc$ .

É importante ressaltar que para a oxi-HbGp em pH 10,0 nenhuma contribuição da proteína íntegra em torno de 58,1 S [72] é observada. Isto sugere que o pH 10,0, alcalino, promove a dissociação oligomérica total da HbGp em subunidades de massa molecular menor como sugerido anteriormente por filtração em gel e em estudos de SAXS [22-28,65]. Outra observação interessante, a partir dos dados mostrados na Tabela 4, é o fato que a contribuição percentual das diferentes espécies da HbGp em pH 10 é bastante semelhante, dentro do erro experimental, independentemente do

comprimento de onda utilizado para o acompanhamento da absorção. As contribuições são de  $39 \pm 3\%$  para o monômero,  $26 \pm 8\%$  para os dímeros de monômeros e linkers,  $25 \pm 4\%$  para os trômeros e  $6 \pm 3\%$  para os tetrômeros. Estes valores correspondem às médias de porcentagem da terceira e quarta linhas da Tabela 4.



**Figura 21:** Distribuição do coeficiente de sedimentação para oxi-HbGp em 100 mmol/L Tris-HCl (pH 10,0), 50 mmol/L NaCl sem  $\beta$ -mercaptoethanol, monitorado em 236 nm. A figura exibe as curvas de  $c(s)$  para as concentrações de HbGp de 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . A inserção mostra os detalhes na distribuição para o intervalo de  $s$  de 4,0 a 6,5. O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o máximo das curvas Gaussianas.

É importante ressaltar o trabalho de Krebs et al [35] sobre as propriedades da subunidade dodecâmero,  $(abcd)_3$ , da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* (HbLt). Os autores observaram que o dodecâmero pode ser obtido a partir da dissociação com

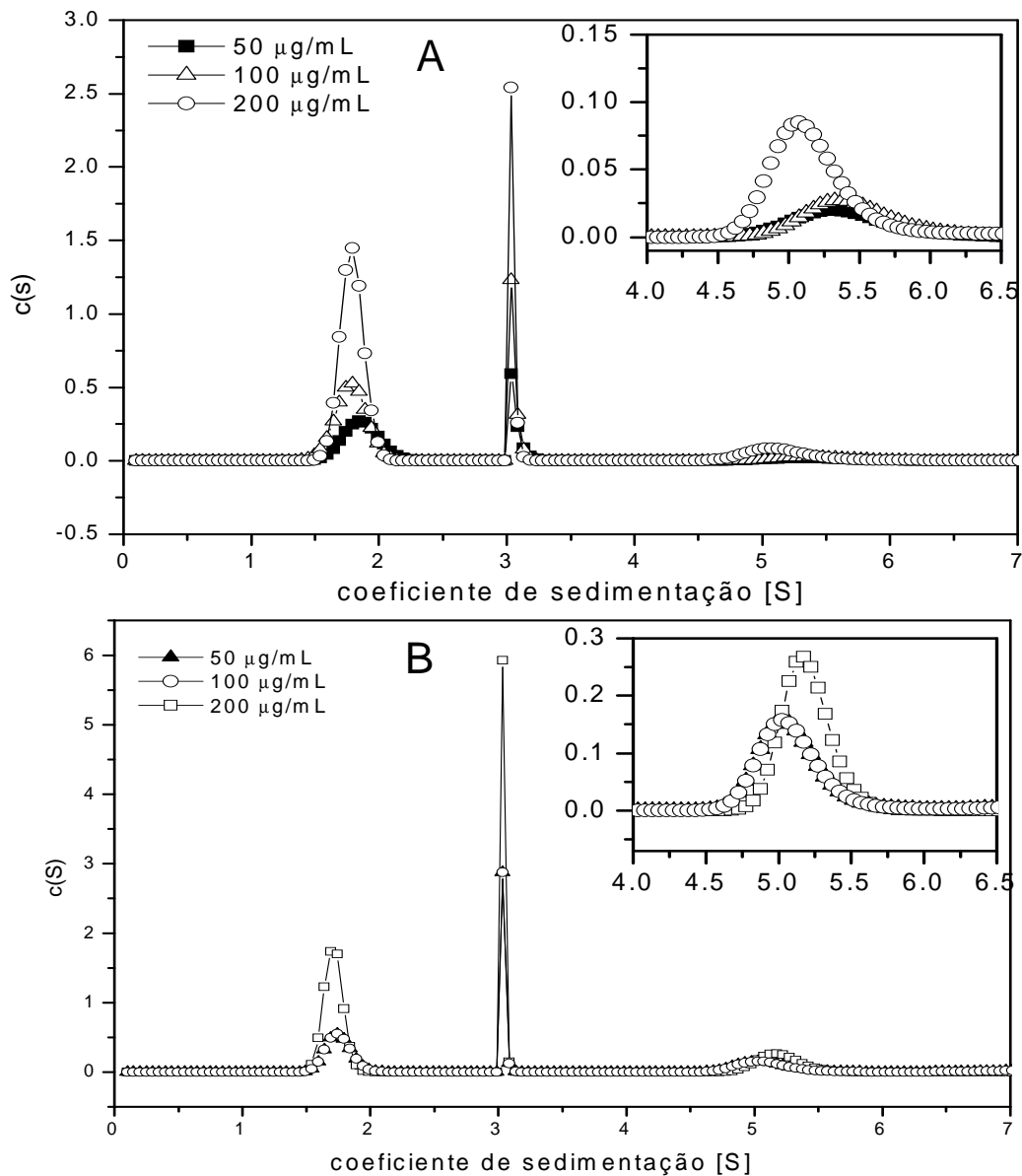
---

uréia da proteína integra. Este processo consistiu de um equilíbrio de três espécies com coeficientes de sedimentação de 8,5 - 9,4 S, 3,6 - 4,4 S e 1,9 S. Os coeficientes de sedimentação obtidos para o monômero neste trabalho, concordam com o valor obtido para HbLt [35]. Também pode-se supor que as espécies observadas em 3,5 - 4,4 S correspondem ao trímero, que também foi observada neste trabalho. Além disso, também é claro que a HbGp, em pH 10,0, não se dissocia originando dodecâmeros, uma vez que nenhum coeficiente de sedimentação no intervalo 8,5 -10,0 foi observado neste experimentos.

A adição de  $\beta$ -mercaptoethanol à oxi-HbGp em pH 10,0 (Figura 22) leva a mudanças significativas nas distribuições  $c(s)$ : a intensidade relativa dos picos em 1,91 e 3,21 S são diferentes e o pico de 4,4 S não é observado. Esta constatação do desaparecimento do pico em 4,4 S é consistente com a atribuição deste pico ao trímero *abc*, pois a adição do  $\beta$ -mercaptoethanol promove a redução das pontes dissulfeto, produzindo os monômeros *a*, *b* e *c* isolados. O aumento no percentual de contribuição monomérica apresentados na Tabela 4 também é coerente com esta interpretação. É também digno de nota que a contribuição percentual das diferentes espécies observadas através do acompanhamento das absorbâncias a 236 e 416 nm, correspondendo, respectivamente, a proteína e aos grupos heme, não são os mesmos para a amostra da HbGp submetida a redução das ponte dissulfeto, Tabela 4. Esta observação é bastante diferente da observada para a oxi-HbGp, em pH 10, na ausência de  $\beta$ -mercaptoethanol.



Os parâmetros obtidos nestes experimentos com base nos ajustes de dados de AUC estão reunidos nas Tabelas 1 e 2.

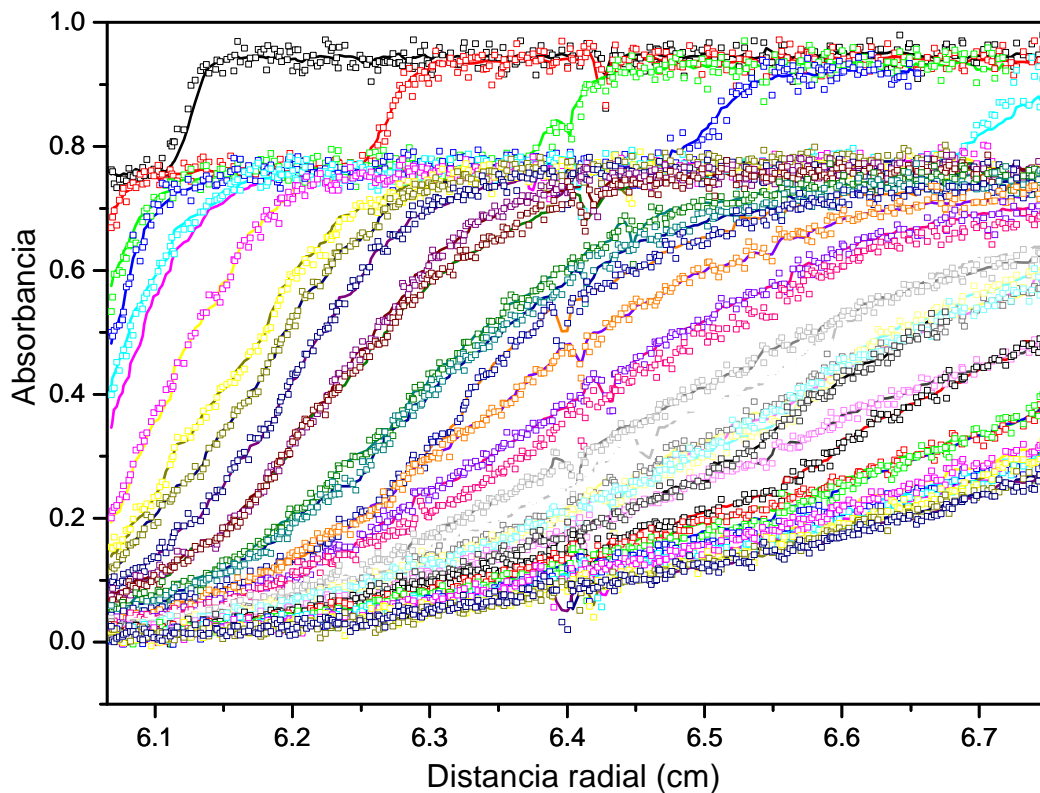


**Figura 22:** Distribuição do coeficiente de sedimentação para oxi-HbGp em 100 mmol/L Tris-HCl (pH 10,0), 50 mmol/L NaCl com  $\beta$ -mercaptoethanol. (A) Oxi-HbGp monitorada em 236 nm e (B) Oxi-HbGp monitorada em 416 nm. A figura exibe as curvas de  $c$  (s) para as concentrações de HbGp de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ . A inserção mostra os detalhes na distribuição para o intervalo de  $s$  de 4,0 a 6,5. O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o máximo das curvas Gaussianas.

---

### 5.1.5. Cianometa-HbGp em pH 10,0

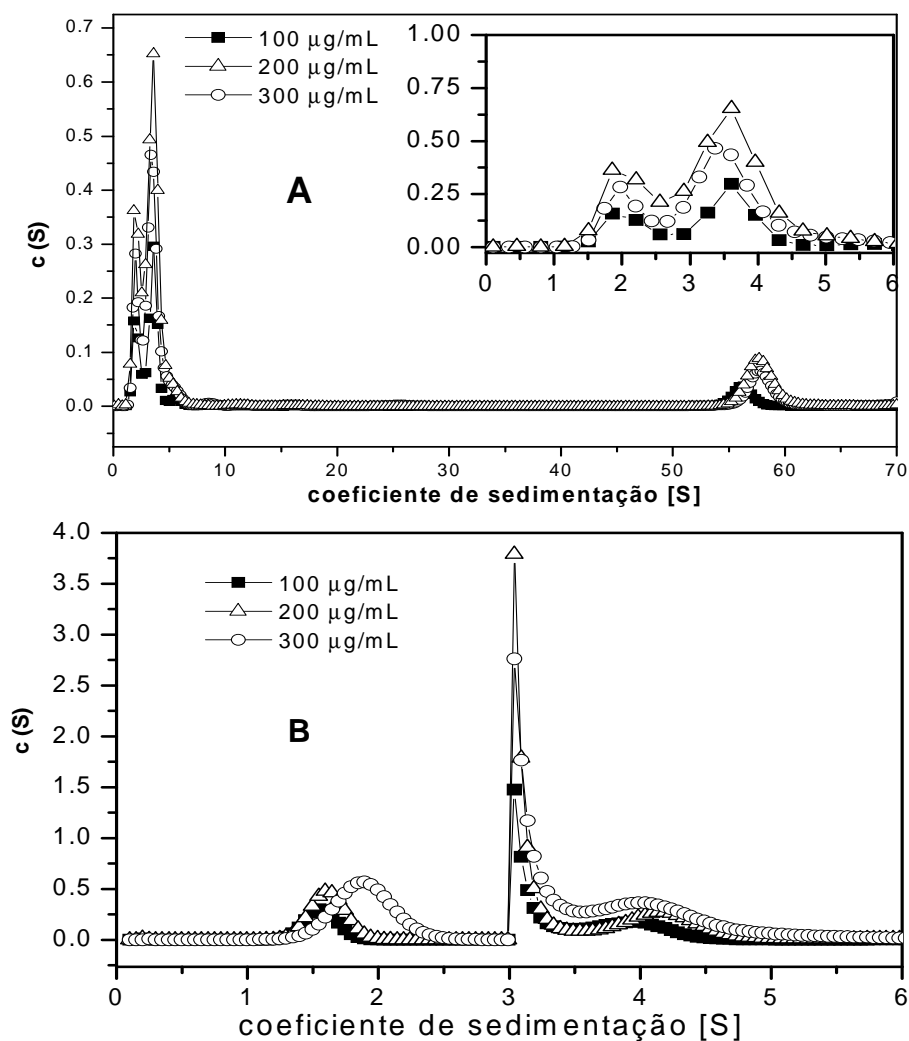
Na Figura 23 são mostrados os dados experimentais obtidos na ultracentrifugação analítica, são apresentados a absorbância versus distância radial da célula para a cianometa-HbGp na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , em pH 10,0. A análise de sedimentação para esta amostra, através do programa SEDFIT, é mostrada na Figura 23, onde as linhas cheias mostram os ajustes e os quadrados correspondem aos dados experimentais. É importante enfatizar, neste caso, que as cinco primeiras curvas mostram claramente a presença de uma heterogeneidade significativa de espécies em solução com os coeficientes de sedimentação bem diferentes. Este dado é bastante consistente com os resultados obtidos das distribuições  $c(s)$  mostrados na Figura 23 para esse exemplo.



**Figura 23:** Dados parciais de velocidade de sedimentação obtidos através do programa SEDFIT. (A) Curvas da Absorbância em 236 nm em função do raio da célula, para cianometal-HbGp 100  $\mu\text{g/mL}$  em tampão Tris-HCl 100 mmol/L 50 mmol/L de NaCl, pH 10,0. O experimento foi realizado a 20  $^{\circ}\text{C}$  e 8.000 rpm (rotor NA-60 Ti ). As linhas cheias representam o ajuste feito no programa SEDFIT e os quadrados representam os dados experimentais.

Na Figura 24 são mostradas as distribuições de  $c$  (s) para a cianometal-HbGp em pH 10,0 nas três concentrações de proteína de 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . Pode-se notar que várias espécies diferentes aparecem na distribuição de uma forma similar ao observado para a oxi-HbGp em pH 10,0, Figura 21. Observam-se picos em 1,80 S, 3,21 S, 4,10 S e 58 S, correspondente ao monômero, dímero de monômeros, trímeros e cianometal-HbGp íntegra não-dissociada, respectivamente. No entanto, os picos da segunda e terceira espécies não têm uma boa resolução (Figura 24) como ocorre, para

a oxi-HbGp. Esta baixa resolução pode estar associada a uma maior complexidade deste conjunto de dados, pois o número de espécies diferentes presente em equilíbrio é relativamente grande.



**Figura 24:** Distribuição do coeficiente de sedimentação para a cianomet-HbGp em 100 mmol/L Tris-HCl (pH 10,0), 50 mmol/L NaCl, monitorado em 236 nm. A figura exibe as curvas de  $c(s)$  para as concentrações HbGp de 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . A inserção mostra os detalhes na distribuição para o intervalo de  $s$  de 0 a 6,0 S (A). Ajuste de  $c(s)$  fixando as propriedades do monômero e o intervalo de sedimentação (B). O  $s$  aparente para cada concentração foi determinado como o máximo das curvas Gaussianas.

---

É também evidente que, para cianometa-HbGp em pH 10,0, uma fração significativa de proteína não dissociada permanece na solução. Essa fração corresponde ao pico de 58 S e está estimada em 19% da proteína total em solução Tabelas 3 e 4. A fim de separar as contribuições das diferentes espécies em solução foram realizados diferentes ajustes por modelos diferentes. Um exemplo desse ajuste é mostrado na Figura 24B, onde os dados experimentais foram analisados no intervalo de coeficiente de sedimentação de 0 a 6 S, sendo fixando os parâmetros do monômero *d*. Este ajuste mostra uma resolução clara do monômero, dímero de monômeros e picos trímeros. Os coeficientes de sedimentação são apresentados na Tabela 2 e suas contribuições percentuais estão resumidas na Tabela 4. A constatação de que quase 19% da cianometa-HbGp permanece não-dissociada no pH 10 é coerente com a maior estabilidade oligomérica exibida por esta forma da proteína em comparação com oxi-HbGp [27,28].

## **5.2. Medidas em meio ácido**

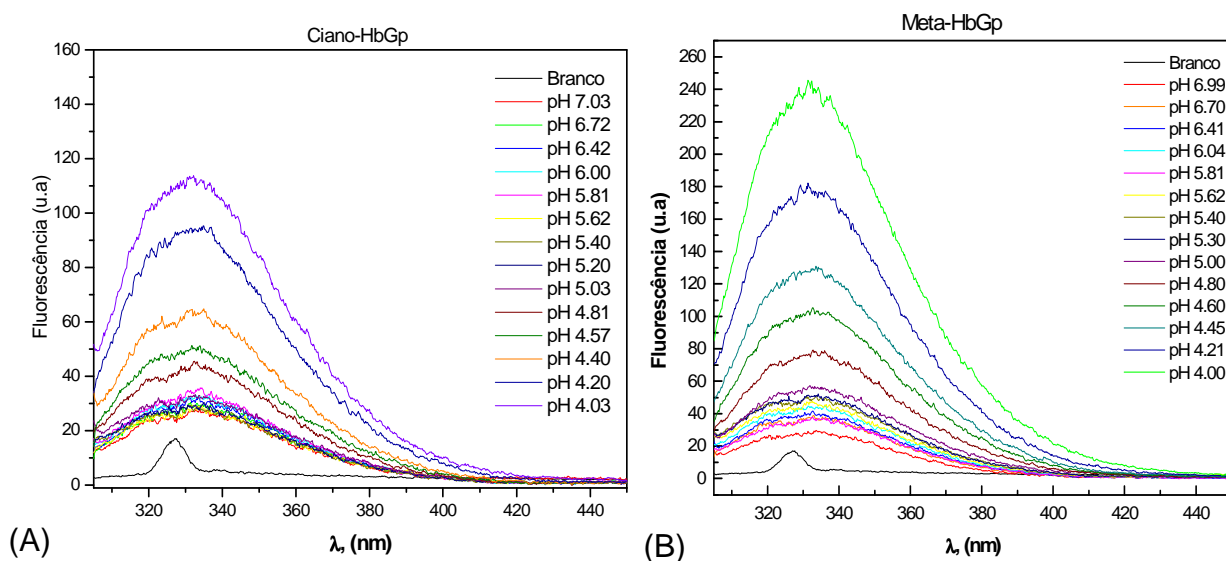
### **5.2.1. Medidas de fluorescência**

As Figuras 25 A e B mostram os espectros de emissão de fluorescência para cianometa- e meta-HbGp em pH ácido, respectivamente. A fluorescência normalizada em relação à fluorescência no pH 7,0 para ambas as formas, é mostrada na Figura 26.

---

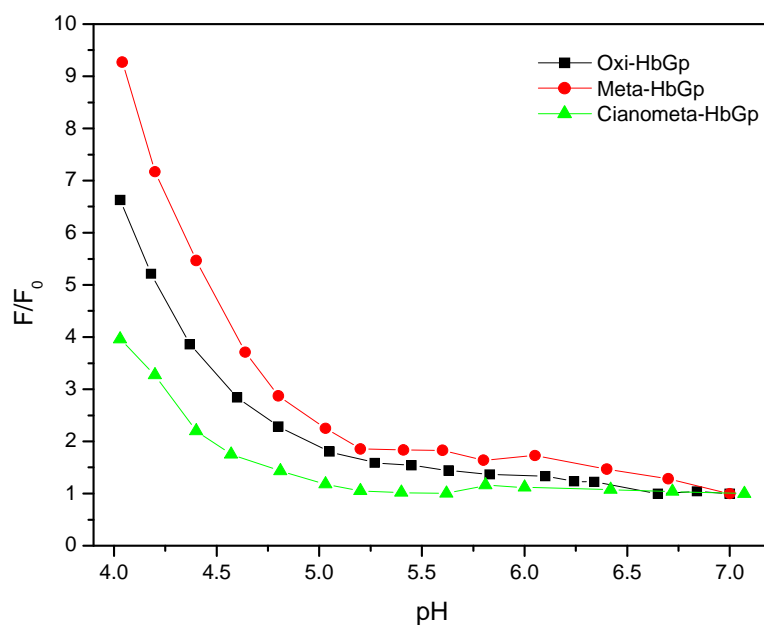
Para valores de pH acima de 5,0 a estrutura oligomérica da proteína mantém-se inalterada, pois a intensidade de fluorescência permanece praticamente constante. No entanto, à medida que de pH torna-se mais ácido, ou seja nos pHs abaixo de 5,0, pode-se observar um aumento drástico na intensidade de emissão de fluorescência, provavelmente associado com dissociação oligomérica e redução de supressão de fluorescência dos triptofanos.

Entretanto, o comportamento das três formas de oxidação estudadas é distinto, sendo observado um aumento significativo da fluorescência, em torno de 7 vezes, para a forma oxi (Figura 26) ao passar do pH 7,0 para o pH 4,0, enquanto que para a cianometa- e a meta-HbGp é observado um aumento de 9 e 4 vezes, respectivamente. A baixa emissão de fluorescência nos valores de pH mais elevado, está associada em parte à transferência de energia do fluoróforo, triptofano, para o grupo heme. Este comportamento é bem comum em hemoproteínas [62]. No entanto, a acidificação do meio também produz um aumento de emissão de fluorescência devido a intensa dissociação parcial do oligômero [62]. A Figura 26 sugere que a dissociação oligomérica se torna mais intensa na faixa de pH abaixo de 5,0.



**Figura 25:** Espectros de emissão de fluorescência da HbGp nas formas ciano (A) e meta (B), 100 µg/mL em tampão acetato-fosfato. Excitação em 295 nm.

Na faixa de pH de 7,0 a 5,0, a intensidade de emissão de fluorescência não muda radicalmente para todas as formas de oxidação de HbGp. No pH abaixo de 5,0, devido a dissociação da proteína oligomérica, uma mudança mais significativa na emissão do triptofano é observada, coerente tanto com a redução da transferência de energia para o grupo heme como pela exposição dos fluoróforos para o solvente. É também digno de notar o fato de que a cianomet-HbGp é a mais estável das três formas, a julgar pelas mudanças menores na emissão de fluorescência Figura 26 observada em toda a faixa de pH utilizadas neste trabalho. Esta é também uma observação esperada considerando a alta estabilidade desta forma de oxidação da proteína [27,28].

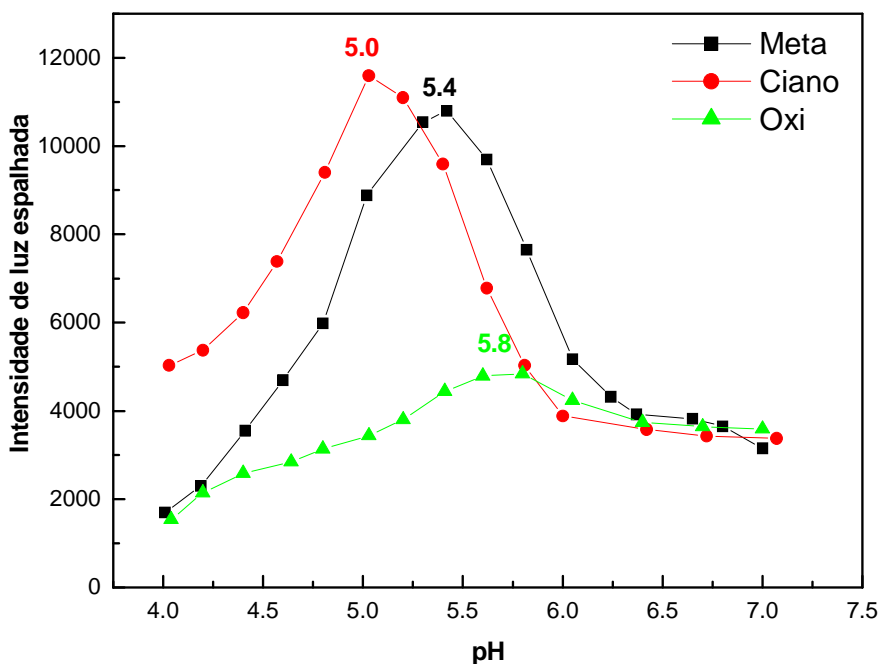


**Figura 26:** Fluorescência normalizada para os valores pH 7,0 para as formas, oxi-HbGp, meta-HbGp e cianometa-HbGp.

### 5.2.2. Espalhamento de luz

O espalhamento de Rayleigh das soluções usadas nos estudos de fluorescência foi acompanhada no fluorímetro para avaliar a agregação da HbGp, induzida pela variação do pH na proximidade do ponto isoelétrico. A Figura 27 mostra a intensidade de luz espalhada de soluções de HbGp para as três formas estudadas em função do pH. A intensidade de luz espalhada, na faixa de pH de 4,0 a 7,0, inicialmente de forma abrupta, caindo para o nível anterior após o aumento do pH.





**Figura 27:** Intensidade de luz espalhada em função do pH para a três formas da HbGp: meta, cianometa e oxi.

Para HbGp na forma oxi, o intervalo de valores de pH em que o aumento da intensidade de espalhamento de luz foi observada é maior quando comparado às formas meta e cianometa. O valor de pH correspondente ao máximo da intensidade de espalhamento de luz em função do pH para a meta-HbGp está bem definido e é aproximadamente no pH 5,4. A intensidade de espalhamento de luz é quase 2,5 vezes maior em comparação com a forma oxi-HbGp. Para a cianometa-HbGp esse valor está em pH 5,0 e a intensidade máxima de dispersão de luz é semelhante à encontrada para a meta-HbGp. Podemos atribuir estes valores de pH correspondentes aos máximos de intensidades de espalhamento ao ponto isoelétrico da proteína nas suas respectivas formas. Estes dados sugerem que o valor de pI para a meta-HbGp é de 5,4, para a

---

cianometa-HbGp é de 5,0 e para oxi-HbGp é de 5,8, com uma incerteza maior para forma oxi. Este valores estão de acordo com valores de pI determinados independentemente através do potencial zeta e de isoeletrofocalização.

## 6. CONCLUSÕES

A massa da HbGp foi determinada quase 20 anos atrás [11]. O baixo valor de massa de 3100 kDa, obtido nesse trabalho, tem sido considerado muito diferente quando comparado aos valores mais elevados, por exemplo, de HbLt [69]. No presente trabalho, uma reavaliação da massa desta hemoglobina gigante foi realizada utilizando metodologia moderna de AUC e com a finalidade de comparar os novos dados experimentais com os resultados recentes a partir da determinação parcial da massa por análise MALDI-TOF-MS das subunidades que constituem a HbGp. A determinação foi realizada para a proteína em ambos os estados de oxidação, oxi e cianometa. Dados da literatura sugerem que a oxidação parcial da hemoglobina poderia afetar os valores experimentais de MM devido à dissociação parcial oligomérica induzida pela auto-oxidação do heme. Por outro lado, a forma cianometa tem-se mostrado bastante estável e resistente em relação à dissociação oligomérica. Os resultados deste presente trabalho mostram que a MM da HbGp é cerca de 3.600 kDa, semelhante a de outras proteínas homólogas descritas na literatura [36,70]. Uma pequena diferença foi observada entre a oxi- e a cianometa-HbGp, sendo que os valores estão praticamente dentro dos limites de incertezas na determinação da MM.

A massa molecular da HbGp observada experimentalmente por AUC está de acordo com o valor esperado com base na determinação por espectrometria de massa

---

[16], e na suposição de uma estrutura oligomérica similar à proposta por Vinogradov para a proteína homóloga de *L. terrestris*. Pela primeira vez, um experimento independente para determinação do  $V_{\text{bar}}$  da HbGp também foi realizado. O valor do  $V_{\text{bar}}$  determinado por densitometria foi de 0,764 mL/g, e está em excelente concordância com os valores estimados pelo software SEDFIT com os dados obtidos de AUC. Essa observação reforça a validade da atual reavaliação da massa molecular da HbGp.

Experimentos de ultracentrifugação para o monômero *d* indicam que esta espécie é bastante pura. No entanto, um equilíbrio dinâmico monômero – dímero é observado. A contribuição dos dímeros é muito baixa, em torno de 5%, similar ao observado por MALDI –TOF-MS [16,17].

As análises em pH neutro 7,0, mostraram que as duas formas da HbGp são bastante homogêneas com apenas uma contribuição na distribuição de  $c(s)$  e  $c(M)$ . Por outro lado, em meio alcalino pH 10,0 a presença de várias espécies em solução foi detectada. Foram observadas quatro espécies em solução para forma oxi correspondente ao: monômero ***d***, dímeros de monômeros ***d*<sub>2</sub>**, trímeros ***abc*** e uma quarta espécie ainda não definida. O segundo pico (dímeros de monômeros ***d*<sub>2</sub>**) apresentou grande intensidade em relação à distribuição na amostra de monômero puro. Pode-se inferir que pode estar havendo a contribuição dos linkers para o aumento da intensidade desta espécie, pois como as massas de dímeros de monômeros ***d*<sub>2</sub>**, 32 kDa e Linkers, de 28 kDa, são muito próximas dificulta a separação destas duas espécies. Já a terceira espécie, trímeros ***abc***, não é observada nas amostras na presença do agente redutor,  $\beta$ -mercaptoethanol, pois as ligações de sulfetos que

---

mantém esta subunidade são quebradas formando espécies monoméricas, monômeros **a**, **b**, **c**, o que está de acordo com o aumento da contribuição da fração monomérica, observado para estas amostras.

Nas amostras da oxi-HbGp não foram observadas nenhuma contribuição de proteína íntegra, sugerindo que em pH 10,0 esta forma encontra-se totalmente dissociada. No entanto, no caso da cianometa-HbGp, foi observada uma contribuição significativa, de cerca de 19%, de proteína na forma íntegra, sugerindo uma maior estabilidade da forma cianometa em meio alcalino.

Comportamento semelhante é observado por fluorescência, onde a cianometa-HbGp mostra-se bem mais estável em meio ácido do que as outras duas formas, meta- e oxi-HbGp.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] STRYER, L. **Bioquímica**. New York: W. H. Freeman, 1995. 1000 p.
- [2] ROUSSELOT, M.; GUEN, D. Le.; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p.1582-1596, 2006.
- [3] KUCHUMOV, A. R.; TAVEAU, J. C.; LAMY, J. N.; WALL, J. S.; WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. The Role of Linkers in the Reassembly of the 3.6 MDa Hexagonal Bilayer Hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, n. 5, p. 1361-1374, 1999.
- [4] GELAMO, Emerson Luiz. **Estudos espectrocópicos das interações da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* e albuminas humana (HSA) e bovina (BSA) com surfactantes iônicos**. 2003. 118 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- [5] KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin?. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology Biochimica. Biophysica. Acta**, v. 1297, n. 2, p. 115 -118, 1996.
- [6] POLI, Alessandra Lima Leves. **Auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*: efeito do pH, do cianeto e do surfactante aniônico SDS**. 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- [7] VOET, D. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1596 p.
- [8] REGIS, William César Bento. **Caracterização das forças envolvidas na estabilidade e na via de enovelamento de globinas**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Bioquímica ) Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.
- [9] FADEL, Valmir. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina isolada do Lobo Guará (*Chrysocyon brachiurus*)**. 2000. 82 f. Dissertação (Mestrado em Física) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2000.

- 
- [10] VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 127-129, 2004.
- [11] COSTA, M. C. P.; BONAFE, C. F. S.; MEIRELLES, N. C. Sedimentation coefficient and minimum molecular-weight of extracellular hemoglobin of *glossoscolex-paulistus* (oligochaeta). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 1, p.115 -118, 1988.
- [12] ROYER, W. E.; KNAPP, J. E.; STRAND, K.; HEASLET, H. A. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 297-304, 2001.
- [13] ROYER, W. E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J. E. Lumbricus erythrocrurin at 3.5 angstrom resolution: Architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1167-1177, 2006.
- [14] ROYER, W. E.; STRAND, K.; VAN HEEL, M.; HENDRICKSON, W. A. Structural hierarchy in erythrocrurin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7107-7111, 2000.
- [15] MEIRELLES, N. C.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, A. R.; DE PAULA, E.; MARANGONI, S.; RENNEBECK, G. M. Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) - Dissociation at Alkaline pH and its Ligand Properties as Revealed by Chemical, Immunochemical and Electron-Microscopy Studies. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology**, v 88, n. 2, p. 377-379, 1987.
- [16] OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Partial characterization of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: A MALDI-TOF-MS study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 5, p. 429-436, 2007.
- [17] OLIVEIRA, Marilene Silva. **Caracterização parcial das reações de fotooxidação e eletrooxidação do dipiridamol e das subunidades de hemoglobina extracelular**. 2008. 117 f. Tese Doutorado (Área de química analítica ) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [18] ZHU, H.; OWNBY, D. W.; RIGGS, C. K.; NOLASCO, N. J.; STOOPS, J. K.; RIGGS, A. F. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris* - Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 30007-30021, 1996.

- 
- [19] FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* - oxygenation properties of isolated chains, trimer, and a reassociated product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10275-10281, 1991.
- [20] SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cethyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 506-517, 2007.
- [21] Santiago, Patrícia Soares. **Interação de porfirinas hidrofílicas e de hemoglobina extracelular com modelos biomiméticos de membrana biológica. 2008.** 187 f. Tese Doutorado (Área de química analítica ) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [22] SANTIAGO, P. S.; MOURA, F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228-2240, 2008.
- [23] MOREIRA, L. M.; SANTIAGO, P. S.; ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): Effects of oligomeric dissociation **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, p.153-163, 2008.
- [24] OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of giant extracel lular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with ionic surfactants: A MALDI-TOF-MS study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 111-119, 2008.
- [25] POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M.; IMASATO, H. SDS (sodium dodecyl sulfate) effect on the autoxidation of the *Glossoscolex paulistus* giant extracellular hemoglobin: Kinetic studies at pH 7.0 and 9.0 **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 52, n. 1, p. 96-104, 2006.
- [26] BISPO, J. A. C.; LANDINI, G. F.; SANTOS, J. L. R.; NORBERTO, D. R.; BONAFE, C. F. S. Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.141, n. 4, p.498–504, 2005.



- 
- [27] AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochimica Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1298, n. 2, p. 148-158, 1996.
- [28] AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M.; IMASATO, H. Fluorescence Studies of Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in Met Form Obtained from Sephadex Gel Filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118A, n. 1, p. 171-181, 1998.
- [29] IMASATO, H.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112B, n. 2, p. 217-226, 1995.
- [30] SHARMA, P. K.; KUCHUMOV, A. R.; CHOTTARD, G.; MARTIN P, D.; WALL, J. S.; VINOGRADOV, S. N. The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8754 - 8762; 1996.
- [31] ARAKAWAA, T.; PRESTRELSKIA, S, J.; KENNEYA, W, C.; CARPENTER, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307 – 326; 2001.
- [32] CHI, E. Y.; KRISHNAN, S.; W. RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9; p. 1325 – 1336; 2003.
- [33] ROUSSELOT, M.; GUEN, D.; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p. 1582 – 1596, 2006.
- [34] RIGGS, A. F. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1073 -1084, 1998.
- [35] KREBS, A.; KUCHUMOV, A. R.; SHARMA, P. K.; BRASWELL, E. H.; ZIPPERT, P.; WEBER, R. E.; CHOTTARD, G.; VINOGRADOV, S. N. Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18695-18704, 1996.
- [36] KAUFMAN, S. L.; KUCHUMOV, A. R.; KAZAKEVICH, M.; VINOGRADOV, S. N. Analysis of a 3.6-MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris* using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analyzer. **Analytical Biochemistry**, v. 259, n. 2, p. 195-202, 1998.

- 
- [37] VOUTSINAS, L.P.; CHEUNG, E.; NAKAI, S. J. Relationships of hydrophobicity to Emulsifying properties of heat denatured proteins. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 26–32, 1983.
- [38] BRAMANTI, E.; ALLEGRINI, C.; ONOR, M.; RASPI, G.; SKOGERBOE, K. J.; SYNOVEC, R. E. Flow injection analysis with diode array absorbance detection and dynamic surface tension detection for studying denaturation and surface activity of globular proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 1, p. 100–113, 2006.
- [39] VINOGRADOV, S. N.; LUGO, S.; MAINWARING, M. G.; KAPP, O. H.; CREWE, A. V. Bracelet protein - A quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 21, p. 8034-8038, 1986.
- [40] LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, p. 2067-2079; 2002.
- [41] BEHLKE, J.; RISTAU, O. Molecular mass determination by sedimentation velocity experiments and direct fitting of the concentration profiles **Biophysical Journal** v. 72, n. 1, p. 428-434, 1997.
- [42] LAUE, T. Biophysical studies by ultracentrifugation. **Biophysical Methods**, v. 11, p. 579–583, 2001.
- [43] VOGEL, V. K.; LANGER, K.; BALTHASAR, S. P.; SCHUCK, P.; MACHTLE, W.; HAASE, W.; VAN DEN BROEK, J. A.; TZIATZIOS, C.; SCHUBERT, D. Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy. **Colloid Polymer Science**, v. 119, p. 31–36, 2002.
- [44] BROWN, P. H.; SCHUCK, P. A new adaptive grid-size algorithm for the simulation of sedimentation velocity profiles in analytical ultracentrifugation. **Computer Physics Communications**. v. 178, p. 105 – 120, 2008.
- [45] DEMELER, B.; BROOKES, E. Monte Carlo analysis of sedimentation experiments. **Colloid Polymer Science**, v, 286, p. 129 – 137, 2007.
- [46] CARRUTHERS, L. M.; SCHIRF, V.R.; DEMELER, B.; HANSEN, J. C. Sedimentation velocity analysis of macromolecular assemblies. **Numerical Computer Methods, Part C**, v. 321, p. 66 -80, 2000.
- [47] LAUE, T. M.; STAFFORD, W. F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 75-100, 1999.
- [48] STAFFORD, W. F.; SCHUSTER, T.M. Hydrodynamic methods. In Introduction to Biophysical. **Methods for Protein and Nucleic Acid Research**, v. p.111-145, 1995.

- 
- [49] SCHUCK, P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1606– 1619, 2000.
- [50] COLE, J. L.; LARY, J. W. MOODY, T. P.; LAUE, T. M. Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. **Biophysical Tools For Biologists: Vol 1 In Vitro Techniques**, v. 84, p. 143-179, 2008.
- [51] HANSEN, J. C.; LEBOWITZ, J. J.; DEMELERI, B. Analytical Ultracentrifugation of Complex Macromolecular Systemst. **Biochemistry**, v. 33, n. 45, p. 13155 -13163, 1994.
- [52] RASA, M.; LOHMEIJER, B. G. G.; HOFMEIER. H.; THIJS, H. M. L.; SCHUBERT. D.; SCHUBERT, U. S.; TZIATZIOS, C. Characterization of Metallo-Supramolecular Block Copolymers by Analytical Ultracentrifugation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 207, p. 2029–2041, 2006.
- [53] STAFFORD, W. F. Boundary analysis in sedimentation-velocity experiments. **Numerical Computer Methods**, v. 240, p. 478-501, 1994.
- [54] SCHUCK, P. Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 3, p. 1503-1512, 1998.
- [55] STAFFORD, W. F. Sedimentation velocity spins a new weave for an old fabric. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p.14-24, 1997.
- [56] GABRIELSON, J. P.; RANDOLPH, T. W.; KENDRICK, B. S.; STONER, M. R.; Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation and SEDFIT c(s): Limits of quantitation for a monoclonal antibody system. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 24– 30, 2007.
- [57] SCHUCK, P.; PERUGINI, M. A.; GONZALES, N. R.; HOWLETT, G. J.; SCHUBERT, D. Sizedistribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. **Biophysical Journal**, v. 82, p.1096 –1111, 2000.
- [58] FISCHER, H.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. V. Average protein density is a molecularweight-dependent function. **Protein Science**, v. 13, p. 2825 – 2828, 2004.
- [59] STOTHART, P. H. Determination of partial specific volume and absoluteconcentration by densimetry. **Biochemistry. Journal**, v. 219, p. 1049 – 1052, 1984.
- [60] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J; NIEMAN,T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

---

[61] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983. p. 341 – 379.

[62] CABRAL, C. B.; IMASATO, H.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; SILVA, C. H. T. P.; Tabak, M.; GARRATT, R. C.; GREENE, L. J. Fluorescence properties of tryptophan residues in the monomeric d-chain of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin: an interpretation based on a comparative molecular model. **Biophysical Chemistry**, v. 97, p. 139–157, 2002.

[63] TSFADIA, Y.; DANIEL, E. A. re-evaluation of the molecular mass of earthworm extracellular hemoglobin from meniscus depletion sedimentation equilibrium: nature of the 10 S dissociation species, **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1433, p. 217–228, 1999.

[64] PILZ, I.; SCHWARZ, E.; VINOGRADOV, S. N. Small-angle X-ray studies of *Lumbricus terrestris* hemoglobin, **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 2, p. 279–283, 1980.

[65] GELAMO, E.; ITRI, R.; TABAK, T. Small angle X-ray scattering (SAXS) study of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: effect of pH, iron oxidation state, and interaction with anionic SDS surfactant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 33298–33305, 2004.

[66] RALSTON, G. **Introduction to analytical ultracentrifugation**. Sydney: Beckman Instruments, Fullerton, CA, 1993. p.99.

[67] DIAS, M. V. B.; BORGES, J. C.; F. ELY, F.; PEREIRA, J. H.; CANDURI, F.; RAMOS, C. H. I.; PALAM, M. S.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DE AZEVEDO Jr., W. F.; Structure of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*, **Journal Structure Biology**. v. 154, p. 130–143, 2006.

[68] MARTIN, P. D.; KUCHUMOV, A. R.; GREEN, B. R.; OLIVER, W. W. A.; BRASWELL, E. H.; WALL, J. S.; VINOGRADOV, S. N. Mass spectrometric composition and molecular mass of *Lumbricus terrestris* hemoglobin: a refined model of its quaternary structure. **Journal Molecular Biological**, v. 255, p.154–169, 1996.

[69] DANIEL, E.; LUSTIG, A.; DAVID, M. M.; TSFADIA, Y.; TOWARDS, A.; Towards a Resolution of the longstanding controversy regarding the molecular mass of extracellular erythrocrucorin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1649, p. 1–15, 2003.

[70] ZHU, H.; HARGROVE, M.; XIE, Q.; NOZAKI, Y.; LINSE, K.; SMITH, S. S.; OLSON, J. S.; RIGGS, A. F. Stoichiometry of subunits and heme content of hemoglobin from the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Jornal Biological Chemistry**, v. 271, p. 29999–30006, 1996.

- 
- [71] OWNBY, D. W.; ZHU, H.; SCHNEIDER, K.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*: determination of subunit stoichiometry, **Jornal Biological Chemistry**, v. 268, p. 13539–13547, 1993.
- [72] CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 257-263, 2008.

## APÊNDICE

### Software SEDFIT (Versão 9.4)

O software SEDFIT é um muito utilizado na análise de dados de velocidade de sedimentação. No entanto, embora a ultracentrifugação analítica tenha sido bastante utilizada no estudo de macromoléculas, esta ainda é uma técnica relativamente pouco conhecida e utilizada em pesquisa. Em parte, isto se deve ao elevado preço do equipamento, o que o torna pouco acessível, e disponível frequentemente apenas em laboratórios multiusuários.

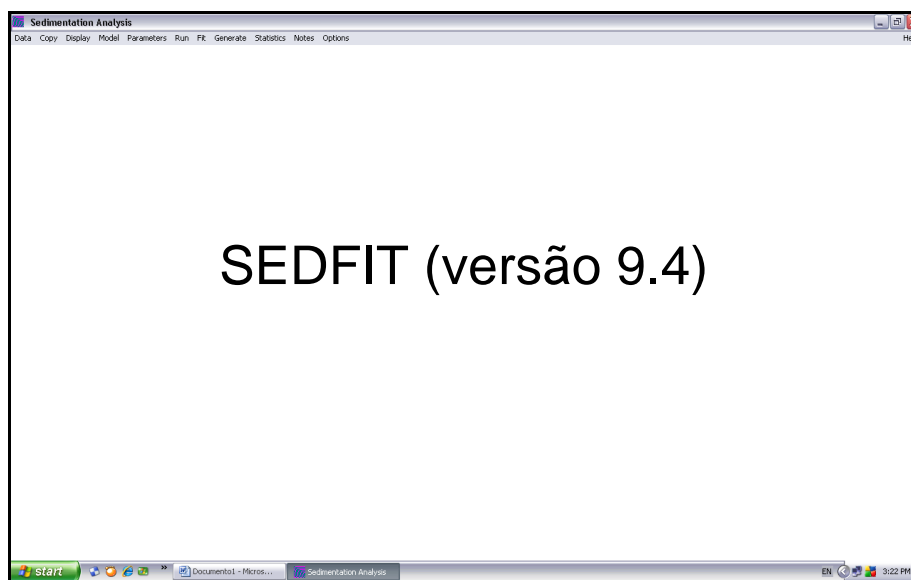
Por acreditarmos que esta técnica e os métodos de análises de dados são poucos conhecidos, propomos nesta seção a elaboração de um pequeno texto auto-explicativo, com o intuito de produzimos um documento útil à comunidade, e que possa vir a contribuir para uma melhor utilização dos recursos que este programa computacional pode oferecer.

Embora o SEDFIT seja pouco usado por alunos e pesquisadores, este software apresenta uma interface de fácil manipulação. Existem vários modelos de tratamento de dados no software que lhe permite calcular vários parâmetros hidrodinâmicos tais como: coeficiente de sedimentação  $s^*$ , coeficiente de difusão (D), volume parcial específico ( $V_{\text{bar}}$ ), razão friccional ( $f/f_0$ ) e a massa molecular (MM). Os modelos mais

utilizados neste trabalho foram às distribuições em função do coeficiente de sedimentação,  $s$ , ou da massa molecular,  $M$ ,  $c(s)$  e  $c(M)$ . Nestes dois modelos existem vários parâmetros que podem ser ajustados ou mantidos fixos a fim de melhorar os ajustes.

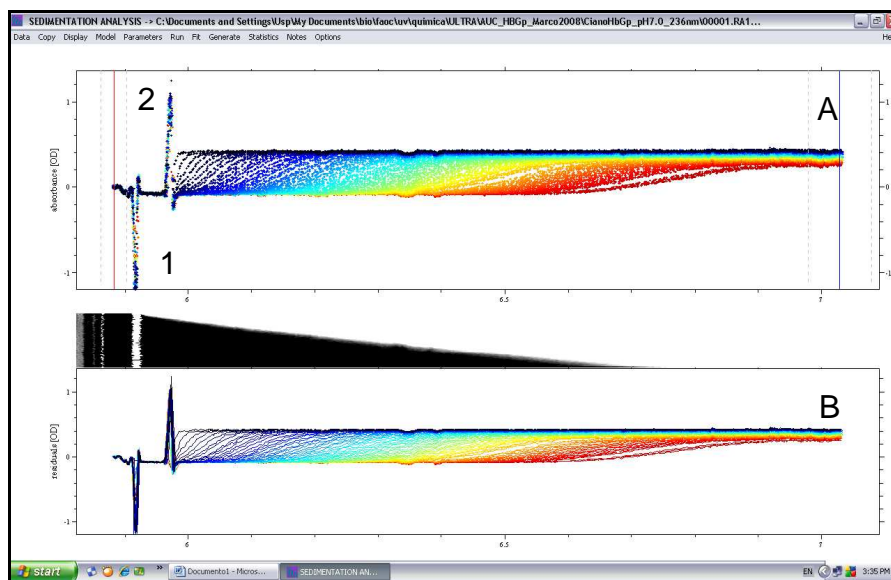
Neste trabalho parâmetros importantes como o coeficiente de difusão e o volume parcial específico foram determinados de maneira independente por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e densitometria, respectivamente.

A Figura 28 mostra a interface de entrada do programa SEDFIT, onde podemos observar vários ícones de comando (Data, Copy, Display, Model, Parameters, Run, Fit, etc), e que permitem aos analistas manusear o programa e tratar os dados.



**Figura 28:** Janela de entrada do programa SEDFIT mostrando os ícones de comando (Data, Copy, Display, Model, Parameters, Run, Fit, etc).

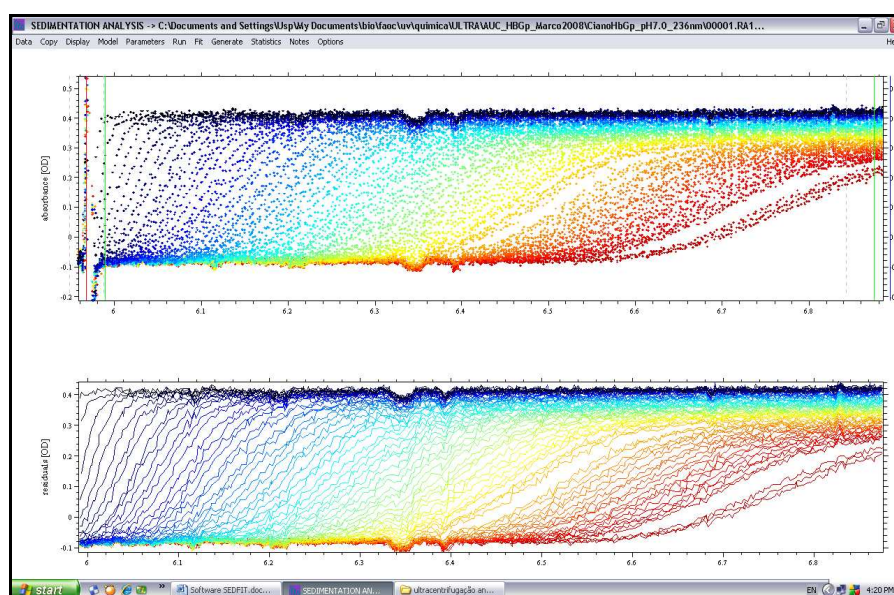
O primeiro passo que devemos fazer para iniciar o tratamento dos dados é buscar os arquivos por meio do comando (Data / Load new Files). Em seguida, as curvas dos dados de velocidade de sedimentação serão mostradas na interface do programa, como mostra a Figura 29. Nesta figura podemos observar além das curvas de absorvância que aparecem na parte superior, os resíduos do ajuste, na parte inferior. Os resíduos são bastante importantes para o processo de análise, pois é a partir deste que podemos avaliar a qualidade, do ajuste realizado. Uma distribuição uniforme dos resíduos com uma pequena variação em torno do zero entre (-0,05 e 0,05) é considerado um bom ajuste. Outro ítem muito importante é o menisco do tampão e da amostras, que devem ser definidos para realizar um bom ajuste.



**Figura 29:** Dados iniciais salvos no programa SEDFIT da cianometa-HbGp 200  $\mu\text{g/mL}$  monitorada em 236 nm. (A) Curvas experimentais da cianometa-HbGp em função da absorvância e da distancia radial. (1) Menisco do tampão e (2) Menisco da Amostra (B)\* Distribuição dos resíduos antes de serem realizados os ajustes. \*Observe que as duas curvas são iguais, no entanto em (B) após o ajuste será apresentada a distribuição dos resíduos a partir das curvas que são mostradas na figura.



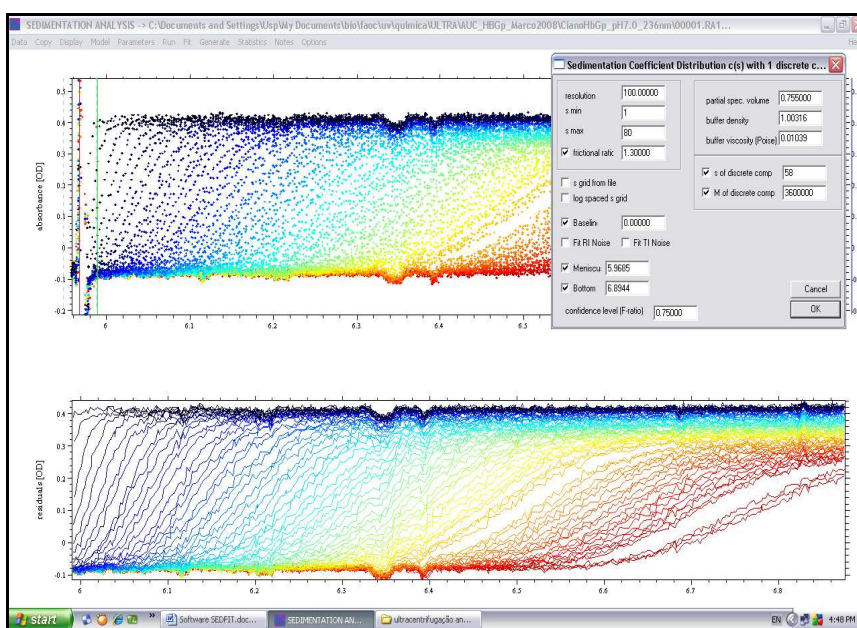
O menisco à esquerda (amostra) deve ser definido de tal modo que, a linha vermelha à esquerda na Figura 29 deve ser movida para o centro da curva do menisco da amostra. O limite da direita deve ser definido no intervalo de 6,85 e 7,00, como mostra a Figura 30. Este parâmetro deve ser bem definido, pois é a partir deste intervalo que são realizados os ajustes.



**Figura 30:** Definição dos meniscos. Curvas experimentais com menisco da esquerda (amostra) e da direita definidos.

Depois da delimitação do intervalo de distâncias, devemos escolher um modelo para ajustar os dados. A escolha do modelo deve ser feita a partir do parâmetro que se deseja encontrar, com base no ícone de comando (Model). Para determinarmos o coeficiente de sedimentação ( $s$ ), volume parcial específico ( $V_{\text{bar}}$ ) e razão friccional ( $f/f_0$ ) o modelo mais indicado é o de distribuição contínua  $c(s)$  (Continuous Distribution  $c(s)$ ). Este modelo, como mencionado anteriormente, apresenta algumas variações que

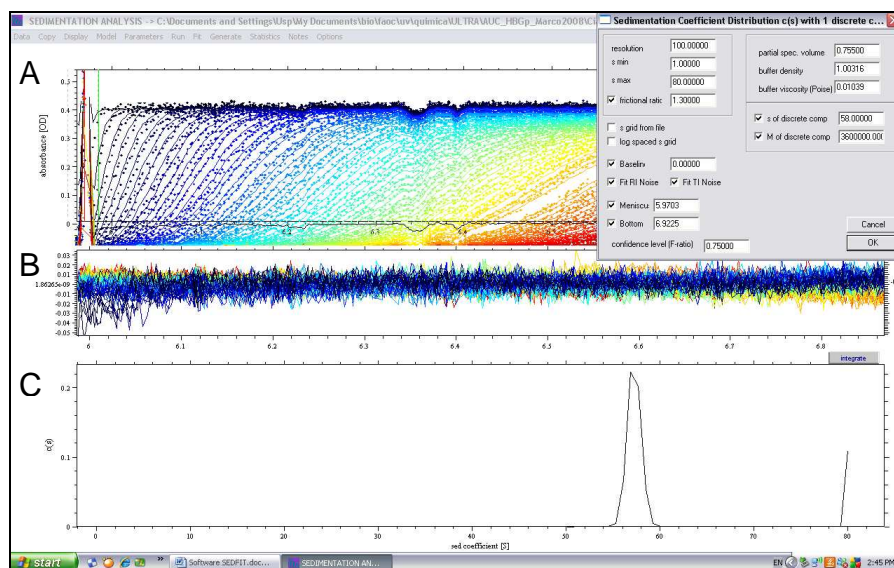
dependem do parâmetro que se deseja determinar e da natureza da amostra. Para amostras puras, ou seja, com apenas uma única espécie, o ajuste com um componente discreto é recomendável (Continuous  $c(s)$  with 1 discrete component). Como podemos observar na Figura 31, os parâmetros  $V_{bar}$ , densidade ( $\rho$ ) e viscosidade ( $\eta$ ) são fixos neste modelo, portanto é importante o conhecimento prévio dos mesmos. Neste modelo é determinada a razão  $f/f_0$  e o coeficiente de sedimentação ( $s$ ).



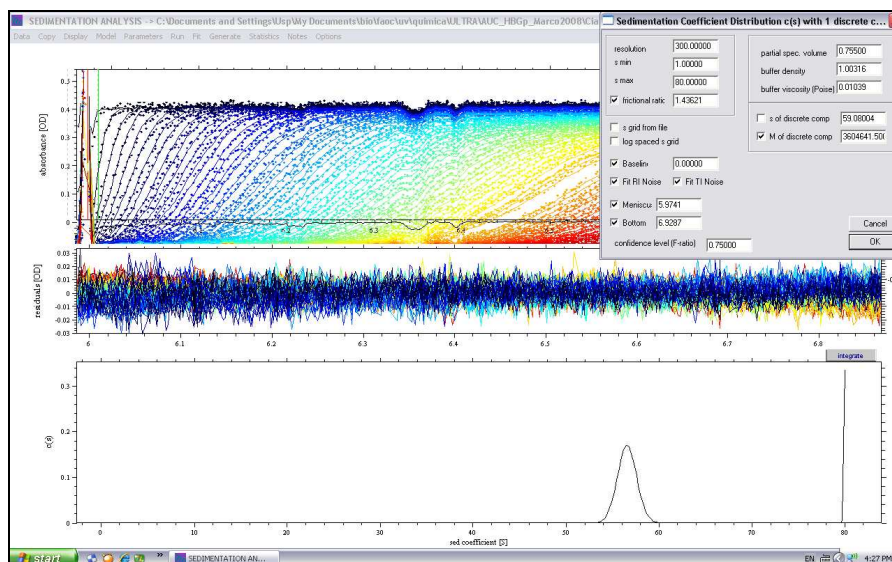
**Figura 31:** Definição dos parâmetros de entrada,  $V_{bar}$ , intervalo do coeficiente de sedimentação, resolução, densidade e viscosidade do tampão, mostrados no quadro à direita. O parâmetro de regularização dos cálculos, ou seja, parâmetro que varia é a razão friccional ( $f/f_0$ ).

Depois que todos os parâmetros são incorporados no modelo e os meniscos definidos, deve-se fazer um ajuste rápido (Run), a fim de avaliar se os parâmetros de entrada e do menisco foram bem definidos. Esta avaliação é feita a partir da análise do perfil dos resíduos, que devem ser distribuídos uniformemente em torno de zero, numa

faixa aceitável de (-0,05 a 0,05), como mostra a Figura 32. Na Figura 32 temos um ajuste rápido (Run), onde podemos observar que este é um bom ajuste dos dados experimentais, já que os resíduos apresentam uma boa distribuição e na parte inferior temos a curva  $c(s)$  com apenas uma contribuição do coeficiente de sedimentação em torno de 58 S. Depois do ajuste rápido (Run), devemos fazer um ajuste mais completo dos dados (Fit), sendo recomendável aumentar a resolução do ajuste, neste caso 300 de resolução é bem razoável. É importante aumentar a resolução, para aumentar o número de pontos na distribuição, melhorando assim o ajuste, Figura 33. Quanto maior a resolução maior o número de pontos na distribuição e melhor fica o ajuste, sendo menor o erro da propriedade hidrodinâmica a ser determinada, neste caso, o coeficiente de sedimentação.

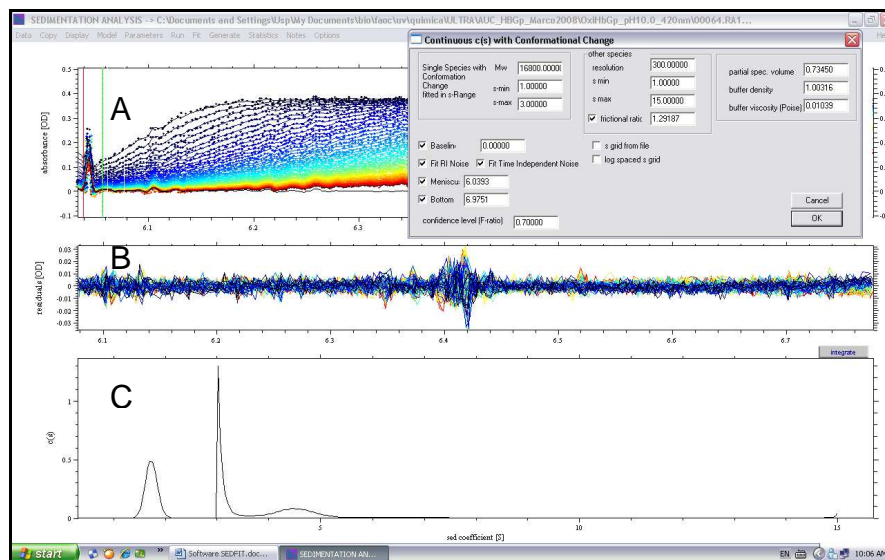


**Figura 32:** Interface do programa SEDFIT mostrando um ajuste rápido (Run) da cianometabólita HbGp. (A) Curvas experimentais (quadrados) e as curvas ajustadas pelo programa SEDFIT (linhas). Observe que as linhas se sobrepõem aos quadrados, indicando que os parâmetros estão bem definidos. (B) Distribuição dos resíduos; (C) Distribuição da  $c(s)$ , mostrando a contribuição de uma única espécie. Note que a distribuição dos resíduos é bem uniforme e em torno de zero.



**Figura 33:** Ajuste idêntico ao da figura 05. No entanto a resolução que anteriormente era de 100 foi aumentada para 300. É muito importante, mesmo que o ajuste seja mais demorado, tratar os dados em uma resolução maior; A distribuição da  $c(s)$  torna-se se melhor definida e os erros diminuem significativamente. Observe que as curvas que aparecem nas duas figuras contribuem em um mesmo coeficiente de sedimentação, porém a da Figura 06 tem uma maior definição.

No entanto, quando a amostra em questão tem contribuição de vários componentes, é preferível usar um modelo de distribuição contínua  $c(s)$ , onde é possível fixar parâmetros de um dos componentes da mistura, para simplificar e melhorar os ajustes. O modelo mais adequado nesta situação é o (Continuous  $c(s)$  Conformational Model). Neste modelo é possível fixar a massa, e o intervalo restrito de coeficiente de sedimentação de uma das espécies na mistura, Figura 34.



**Figura 34:** Dados da oxi-HbGp pH 10,0 tratada pelo Modelo Continuo  $c(s)$  Conformational Model. (A) Curvas experimentais (quadrados) e as curvas ajustadas pelo programa SEDFIT (linhas). Observe que as linhas se sobrepõem aos quadrados, indicando que os parâmetros estão bem definidos. (B) Distribuição dos resíduos; (C) Distribuição da  $c(s)$ , mostrando a contribuição de várias espécies. A presença de várias espécies ocorre devido à oxi-HbGp sofrer dissociação em meio alcalino (pH 10,0). Note que a distribuição dos resíduos é bem uniforme e em torno de zero.

Outro modelo utilizado neste trabalho foi à distribuição continua  $c(M)$  (Continuous  $c(M)$  with other prior knowledge). Este modelo é útil para determinar a massa de moléculas com alto grau de pureza. Neste modelo, o parâmetro de regularização variável é a razão  $f/f_0$ , enquanto que os demais parâmetros são fixos.

No entanto, podemos observar que independente do modelo escolhido, seja para amostras bastante homogêneas ou complexas é claro que para uma boa análise dos dados e para uma maior confiabilidade nos mesmos, a determinação de parâmetros independentes com  $V_{bar}$ ,  $f/f_0$  e  $D$  devem ser feitas e introduzidos nos modelos.

---

É possível extrair os dados das curvas de distribuição e resíduos diretamente para o Origin, a partir da ferramenta, (Copy Distribution Plot) e (Copy Residuals Plot) na interface do SEDFIT, respectivamente.